



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ –
ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ DNA
ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕΛΙΩΝ ΚΑΙ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ DNA
ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑΤΟΣ
ΜΕΛΙΟΥ

ΕΛΕΝΗ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΥΣ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2019

ΛΑΡΙΣΑ

ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ DNA ΑΠΟ
ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕΛΙΩΝ ΚΑΙ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ DNA ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΕΛΕΤΗ
ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑΤΟΣ ΜΕΛΙΟΥ

OPTIMIZATION OF DNA EXTRACTION METHODS FROM HONEY
SAMPLES AND USE OF DNA FOR THE STUDY OF HONEY
MICROBIOME

Τριμελής επιτροπή:

Μόσιαλος Δημήτριος (επιβλέπων): Επίκουρος καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μαρκουλάτος Παναγιώτης: Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Αμούτζιας Γρηγόρης: Επίκουρος καθηγητής Βιοπληροφορικής στη Γενωμική του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Περίληψη:

Το μέλι είναι γνωστό για τις αντιμικροβιακές του ιδιότητες, ωστόσο δεν είναι στείρο από μικροοργανισμούς. Οι μικροοργανισμοί, που μπορούν να επιβιώσουν μέσα στο μέλι είναι ανεκτικοί στην υψηλή συγκέντρωση σακχάρων, οξύτητας και άλλων αντιμικροβιακών χαρακτηριστικών του μελιού. Οι μικροοργανισμοί που έχουν ταυτοποιηθεί στο μέλι προέρχονται είτε από την γύρη και τα λουλούδια, είτε από τον αέρα και τη σκόνη, είτε από τη μέλισσα.

Στην παρούσα εργασία απομονώθηκε DNA, από ελληνικά μέλια διαφορετικής φυτικής προέλευσης, με την χρήση 5 διαφορετικών μεθόδων έτσι ώστε να επιλεγθεί η καταλληλότερη. Έπειτα, για να διαπιστωθεί η ποιότητα του DNA έγινε ενίσχυση των V3-V4 περιοχών του 16 r RNA για τα βακτήρια.

Η πιο αποτελεσματική μέθοδος εκχύλισης DNA από μέλι, τόσο στην ποιότητα όσο και στην ποσότητα είναι η εκχύλιση DNA μέσω *Wizard*. Ωστόσο, σε ένα δείγμα η μέθοδος CTAB/ χλωροφόρμιο έδειξε καλύτερα αποτελέσματα.

Αφού έγινε ο ποιοτικός έλεγχος, δείγμα από ένα ελληνικό μέλι ελάτου (που απομονώθηκε DNA με την μέθοδο *Wizard*) στάλθηκε στην MacroGen Inc., έτσι ώστε να γίνει αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS) μέσω του Illumina MiSeq PE300 και να διερευνηθεί η ποικιλότητα βακτηρίων και μυκήτων. Στο μικροβίωμα του δείγματος μελιού ελάτου κυριαρχούν τα *Lactobacillus spp*, *Sphingomonas*, *Bacillus spp*, *Pseudomonas* και *Acetobacter spp*, με ποσοστά 82, 5, 1, 1, 1% αντίστοιχα όσον αφορά τα βακτήρια. Ενώ, όσο αφορά τους μύκητες, επικρατούν οι φυλότευποι *Candida*, *Dothideales*, *Wickerhamomyces*, *Capnoidiales* και *Zygosaccharomyces mellis* με ποσοστά 18, 10, 12 και 9%, αντίστοιχα.

Συγκριτικά, με το μέλι Vitex που παράγεται στην Κίνα όπου έχει γίνει ανάλογη μεταγονιδιαμιακή ανάλυση παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στο μικροβίωμα.

Αξιοσημείωτη διαφορά παρατηρείται στην αφθονία του *Bacillus spp.* όπου στο μέλι Vitex επικρατεί με ποσοστό 67%, σε αντίθεση με το ελληνικό μέλι που το ποσοστό του δεν ξεπερνάει το 1%. Η σημαντικότερη διαφορά παρατηρείται στα ακραία ποσοστά του γένους *Lactobacillus*. Στο ελληνικό μέλι από έλατο συναντάται ως το υψηλότερο ποσοστό βακτηρίων (82%), σε αντίθεση με το μέλι Vitex που συναντάται σε ποσοστό μικρότερο του 1% (0.6%).

Η παρουσία λακτοβακκίων στο μικροβίωμα του ελληνικού μελιού είναι πιθανό να προέρχεται μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα της μέλισσας καθώς είναι γνωστό ότι ανήκει στο μικροβίωμα της . Λακτοβάκκiliους συναντάμε και στο μικροβίωμα του ανθρώπου και είναι το συνηθέστερο προβιοτικό. Απαιτείται περαιτέρω μελέτη, έτσι ώστε να διαπιστωθεί το προβιοτικό δυναμικό των λακτοβακκίων του ελληνικού μελιού.

Abstract:

Honey is known for its antimicrobial properties, but it is not sterile. Microorganisms that can survive in honey are tolerant of high concentrations of sugars, acidity and other antimicrobial properties of honey. The micro-organisms identified in honey come either from pollen and flowers, from air and dust, or from the bee.

In this work, DNA was isolated from Greek honeys of different plant origin, using 5 different methods to select the most appropriate one. Subsequently, DNA quality was checked by amplification of V3-V4 regions of the 16 r RNA bacterial gene.

The most effective method of extracting DNA from honey, both in quality and quantity, is DNA extraction via Wizard. However, in one sample the CTAB / chloroform method showed better results.

After the quality control, a sample of a Greek fir honey (DNA extracted by Wizard method) was sent to Macrogen Inc., so that the next generation sequencing (NGS) could be sequenced through the Illumina MiSeq PE300 and the bacterial and fungal diversity investigated. . The microbiome of the fir honey sample is dominated by *Lactobacillus spp*, *Sphingomonas*, *Bacillus spp*, *Pseudomonas* and *Acetobacter spp*, with bacterial percentages of 82, 5, 1, 1, 1% respectively. In the case of fungi, *Candida*, *Dothideales*, *Wickerhamomyces*, *Capnodiales* and *Zygosaccharomyces mellis* have the highest prevalence of fungi with 18, 10, 12 and 9%, respectively.

In comparison, with the Vitex honey produced in China where similar post-genomic analysis was performed, significant differences were observed in the microbiome.

A remarkable difference is observed in the abundance of *Bacillus spp.* In Vitex honey the abundance is above 67%, in contrast to Greek honey which does not exceed 1%. The most significant difference is observed in the extreme percentages of the genus *Lactobacillus*. In Greek fir honey. It is found to be the highest percentage of bacteria (82%), in contrast to Vitex honey which is less than 1% (0.6%).

The presence of *lactobacilli* in the microbiome of Greek honey is likely to originate through the gastrointestinal tract of the bee as it is known to belong to its microbiome. *Lactobacillus* can also be found in the human microbiota and is the most common probiotic. Further study is needed to determine the probiotic potential of Greek honey *lactobacilli*.

1.Εισαγωγή

1.1 Τι είναι το μέλι;

Σύμφωνα με την Κοινοτική Οδηγία 2014/63 της Ευρωπαϊκής Ένωσης, μέλι είναι η φυσική γλυκιά ουσία που παράγουν οι μέλισσες του είδους *Apis mellifera* από το νέκταρ των φυτών ή από εκκρίσεις ζώντων μερών φυτών ή εκκρίματα εντόμων απομυζούντων φυτά ευρισκόμενα πάνω στα ζώντα μέρη των φυτών, τα οποία οι μέλισσες συλλέγουν, μετατρέπουν αναμιγνύοντας με ειδικές ύλες του σώματός τους, αποθέτου, αφυδατώνουν, εναποθηκεύουν και φυλάσσουν στις κυθήρες της κυψέλης, προκειμένου να ωριμάσουν.

Οι απαιτήσεις αυτές συνάδουν και με το πρότυπο του Codex Alimentarius για το μέλι (Codex Stan 12-1981). Όταν το νέκταρ εισέλθει στο στομάχι της μέλισσας, σταδιακά μετατρέπεται σε μέλι. Τα ένζυμα από τους αδένες της κεφαλής που ονομάζονται διαστάσες-ιμβρερτάσες και ένζυμα από θωρακικό αδέν (οξειδάση της γλυκόζης) αναμειγνύονται με το νέκταρ με σκοπό το σχηματισμό της γεύσης και του αρώματος του μελιού (Abdullah and Clemencia, 2009).

1.2 Από το νέκταρ στο μέλι

Η πρώτη ύλη λοιπόν του μελιού είναι το νέκταρ από το οποίο παράγεται το ανθόμελο και το μελίτωμα. Το νέκταρ το παίρνουν οι μέλισσες από τα άνθη ενώ το μελίτωμα προέρχεται από τα παράσιτα των φυτών. Τα παράσιτα

απορροφούν το χυμό, ο οποίος περνά από το πεπτικό τους σύστημα όπου και σχηματίζεται το μελίτωμα, το οποίο χρησιμοποιούν για τις ανάγκες τους.

Αυτό που περισσεύει βγαίνει με τη μορφή σταγονιδίων, που οι μέλισσες απομυζούν από το σώμα των παρασίτων ή από τα φύλλα των φυτών όπου πέφτει το μελίτωμα (Δερματόπουλος, 1949). Οι συλλέκτριες προσθέτουν στο νέκταρ και στο μελίτωμα σάλιο και το μεταφέρουν στις κυψέλες.

Η διαδικασία μετατροπής του νέκταρ σε μέλι ξεκινά από τον προλοβό της μέλισσας με προσθήκη ενζύμων από τους σιελογόνους και υποφαρυγγικούς αδένες της. Οι υποφαρυγγικοί αδένες βρίσκονται στο πάνω μέρος του κεφαλιού της μέλισσας και είναι δύο λεπτοί και μακροί αγωγοί με πολλές διακλαδώσεις. Είναι ανεπτυγμένοι στην νεαρή εργάτρια και είναι υπεύθυνοι για τον σχηματισμό του βασιλικού πολτού (White, 1993). Στις, μεγαλύτερης ηλικίας, εργάτριες μέλισσες οι αδένες αυτοί συρρικνώνονται και παράγουν το ένζυμο ιμβερτάση, που είναι απαραίτητο για την μετατροπή του νέκταρ σε μέλι και το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης, που μετατρέπει την γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ. (Abdullah and Clemencia, 2009, White, 1993)

Κατά τη μετατροπή του φυσικού αυτού χυμού (νέκταρ) σε μέλι, γίνεται μεταβολισμός σακχάρων, κυρίως η αποδόμηση του δισακχαρίτη σουκρόζη

(της κοινής ζάχαρης) στους άμεσα αφομοιώσιμους μονοσακχαρίτες γλυκόζη και φρουκτόζη. Η ανασύνθεση σε δισακχαρίτες και τρισακχαρίτες είναι πολύ περιορισμένη.

Οι αρωματικής ενώσεις (τερπένια) και οι χρωστικές ουσίες από το νέκταρ δεν μεταβολίζονται, ενώ το μέλι εμπλουτίζεται και με το άρωμα των οργανικών οξέων που προκύπτουν από την διάσπαση της γλυκόζης. Επίσης, το μέλι εμπλουτίζεται συνεχώς με ένζυμα από τους αδένες της εργάτριας μέλισσας, τα οποία διασπούν τα σάκχαρα, όπως αναφέρθηκε. Τέλος, τα μεταλλικά στοιχεία του μελιού είναι ακριβώς τα ίδια με αυτά που περιέχονται και στον πρωτογενή φυτικό χυμό (White, 1993).

Ο μεταβολισμός των σακχάρων του νέκταρος και του μελιτώματος συνεχίζεται και ολοκληρώνεται μέσα στα κελιά των κηρήθρων, από την ώρα που οι φυτικοί χυμοί αποθηκεύονται μέσα σε αυτές.

Η ικανότητα των κοινωνικών μελισσών ως ειδών εντόμων να μετατρέπουν το ευαίσθητο σε ζυμώσεις (αλλοιώσεις) νέκταρ και αντίστοιχα μελίτωμα στο εξαιρετικά συντηρήσιμο μέλι αποτελεί για αυτές έναν από τους βασικούς μηχανισμούς προσαρμογής τους στη φύση, ο οποίος διασφαλίζει την επιβίωση τους (Υφαντίδης, 2005).

Τέλος, η σύνθεση του μελιού εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως:

- Τα είδη των φυτών από όπου συλλέγουν το νέκταρ και το μελίτωμα

- Τη φύση του εδάφους
- Το είδος των μελισσών
- Τη φυσική κατάσταση του μελισσιού (Υφαντίδης, 1983).

1.3 Διατροφική αξία και συστατικά του μελιού

Το μέλι είναι το προϊόν που παράγουν οι μέλισσες από το νέκταρ ή τα διάφορα μελιτώματα φυτών και αποτελεί μια πολύτιμη φυσική θρεπτική τροφή, αναπόσπαστο στοιχείο της μεσογειακής δίαιτας. Αποτελείται κυρίως από απλά σάκχαρα αλλά και από πλήθος άλλων στοιχείων.

Ανιχνεύτηκαν και πιστοποιήθηκαν 182 διαφορετικές ουσίες (Winston,1987). Το προϊόν αυτό αποτελείται 70-80% από *σάκχαρα*, κυρίως γλυκόζη και φρουκτόζη και έχει μεγάλη θρεπτική αξία, και απορροφάται άμεσα από τον ανθρώπινο οργανισμό (1 κουταλιά της σούπας μέλι αποδίδει στον οργανισμό 64 Kcal).

Περιέχει νερό σε ποσοστό 16% , *οργανικά οξέα* (18), *πρωτεΐνες* και *αμινοξέα*, *μεταλλικά στοιχεία* σε μικρές ποσότητες (κάλιο, ασβέστιο, μαγνήσιο, σίδηρος κ.ά.), *ένζυμα* (τα οποία σχεδόν στο σύνολο τους από τους αδένες των μελισσών και είναι αυτά που μετατρέπουν το νέκταρ και το μελίτωμα των φυτών σε μέλι (Σταθόπουλος, 1993)), *συμπλέγματα πρωτεϊνών*, *βιταμίνες* (B2, B6, C, D, E, παντοθενικό οξύ, φολικό οξύ κ.ά.), *φυσικές αρωματικές ουσίες* κ.ά.. Επιπλέον, το μέλι έχει υψηλή ενεργειακή και θρεπτική αξία. Τα ανόργανα στοιχεία του μελιού συμμετέχουν σε

διάφορα ενζυμικά συστήματα και παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό. Αυτό που προκαλεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι η συνύπαρξη όλων των θρεπτικών στοιχείων και ο τρόπος με τον οποίο δρουν στον ανθρώπινο οργανισμό.

Το μέλι αποτελεί ένα φυσικό γλυκαντικό με μεγάλη γλυκαντική δύναμη χάρη στη φρουκτόζη και μετατρέπεται αμέσως σε ενέργεια λόγω της γλυκόζης (σε 15 λεπτά περνά στο αίμα). Δυναμώνει και τονώνει τον οργανισμό σε περίπτωση κόπωσης σωματικής ή πνευματικής, ανάπτυξης και ανάρρωσης γιατί εμπλουτίζει άμεσα το αίμα με γλυκόζη και έτσι αποτελεί ένα φυσικό τονωτικό του οργανισμού. Είναι μια πλούσια και που δίνει άμεση ενέργεια σε τροφή για παιδιά, εγκύους, αθλητές, άτομα που βρίσκονται σε ανάρρωση καθώς και για ανθρώπους που ασκούν υψηλή σωματική ή πνευματική εργασία (National Honey Board, 2010).

Επιπροσθέτως, αποδείχθηκε ως ένα πολύ ωφέλιμο προϊόν για τη διαίτα του παιδικού οργανισμού. Σε έρευνες διαπιστώθηκε ότι η διατροφή με μέλι αύξησε την αιμοσφαιρίνη του αίματος των παιδιών και αύξησε το βάρος τους χωρίς να παρατηρηθεί παράλληλα αύξηση του σακχάρου στο αίμα ή της οξύτητας στο ουρικό οξύ. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι φάρμακα σε συνδυασμό με μέλι είχαν καλύτερα θεραπευτικά αποτελέσματα.

Τα υπάρχοντα στοιχεία στο μέλι όπως κάλιο, φώσφορος, φολικό οξύ και παντοθενικό οξύ βοηθούν στην ανάπτυξη του οργανισμού. Η πληθώρα των ιχνοστοιχείων του μελιού πιθανώς συμπληρώνει ελλείψεις της διαίτας σε

άτομα που δεν τρέφονται καλά καθώς και σε ηλικιωμένα άτομα (εκατό γραμμάρια μέλι παρέχουν στον άνθρωπο 315θερμιδες) .
Τέλος πολλοί αποδίδουν τη μακροζωία τους στη συστηματική διατροφή τους με μέλι (Μπίκος, 1991).

1.4 Ευεργετικές δράσεις του μελιού

Το μέλι έχει ευεργετικές δράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό (Herold, 1970) και κάποιες από αυτές είναι:

- Το μέλι ως δυναμωτικό
- Επιδράσεις στην καρδιά
- Επιδράσεις στο ήπαρ
- Επιδράσεις στο πεπτικό σύστημα
- Επούλωση τραυμάτων
- Αντιφλεγμονώδης δράση
- Αντιοξειδωτική δράση
- Υποβοήθηση του ανοσοποιητικού συστήματος

1.5 Τα είδη μελιού

Η ταξινόμηση των μελιών γίνεται σε δύο κατηγορίες: τα μέλια των ανθέων (ή νέκταρος) που προέρχονται από το νέκταρ των φυτών και τα μέλια μελιτώματος που προέρχονται από τους φυσικούς χυμούς των φυτών και των εντόμων που τρέφονται από τα φυτά αυτά. Η χημική σύνθεση του μελιού ποικίλλει από είδος σε είδος.

- Μέλια ανθέων: πορτοκαλιάς, θυμαριού, ευκάλυπτου, δεντρολίβανου, λεβάντας, λυγαριάς, ακακίας, κουμαριάς, καστανιάς είναι μερικά από τα μέλια που προέρχονται από το νέκταρ που παράγουν τα αντίστοιχα φυτά.
- Μέλια μελιτώματος: το μέλι του πεύκου και του ελάτου είναι μερικά από τα μέλια που προέρχονται τα αντίστοιχα φυτά (Θρασυβούλου & Μανίκης, 1990).

Οι εδαφοκλιματικές συνθήκες της Ελλάδας ευνοούν την ανάπτυξη του εντόμου *Marchalina hellenica* (κοινώς εργάτης ή βαμβακάδα) το οποίο παρασιτεί στα πεύκα και εκκρίνει μελίτωμα. Οι μελιτώδεις εκκρίσεις συλλέγονται από τις μέλισσες, μεταποιοούνται και αποθηκεύονται ως μέλι. Η μεγαλύτερη παραγωγή μελιού στην Ελλάδα (60-65%) προέρχεται από τις μελιτώδεις εκκρίσεις του «εργάτη» και το μέλι που παράγεται είναι γνωστό ως πευκόμελο.

Η παραγωγή των μελιτωμάτων επηρεάζεται από το μέγεθος (ή ηλικία) του εντόμου, τη ζωτικότητα του δέντρου, τις κλιματολογικές συνθήκες και το είδος του πεύκου στο οποίο παρασιτεί το έντομο (Καϊλίδης, 1965). Στην περίοδο των αλλαγών του δέρματος (εκδύσεων) καθώς και όταν

ενηλικιωθεί, το έντομο δεν τρέφεται και δεν παράγει μελίτωμα. Οι μέτριες θερμοκρασίες με δροσερό καιρό ευνοούν την κυκλοφορία των χυμών του πεύκου και την άφθονη παραγωγή μελιτοεκκρίσεων σε αντίθεση με τις υψηλές θερμοκρασίες και τη μεγάλη ξηρασία.

Ο εργάτης αποβάλλει περισσότερες μελιτοεκκρίσεις όταν παρασιτεί στην τραχεία (*Pinus brutia* Ten.) παρά στη χαλέπιο (*Pinus halepensis* Miller) (Τυπάλδος-Ξυδιάς, 1979).

Θεωρητικά, οι μέλισσες παράγουν τόσα μέλια όσα είναι και τα φυτά που δίνουν νέκταρ και μελίτωμα. Πρακτικά όμως, δεν έχουμε τόσα πολλά μέλια διότι οι ποσότητες που παράγονται δεν είναι μεγάλες.

Κάθε περιοχή παράγει τα δικά της μέλια ανάλογα με την ανθοφορία της. Όταν σε μια περιοχή δεν υπάρχει μια επικρατούσα ανθοφορία, το μέλι που θα παραχθεί θα είναι μέλι ποικίλης ανθοφορίας ενώ όταν υπάρχει μια επικρατούσα ανθοφορία τότε το μέλι θα πάρει τα χαρακτηριστικά της (γεύση, άρωμα, χρώμα) και θα ονομαστεί ανάλογα π.χ. μέλι θυμαριού (Θρασυβούλου, 2001). Το χρώμα του μελιού ποικίλλει από σχεδόν άχρωμο έως καφέ σκούρο. Ως προς τη σύσταση, μπορεί να είναι ρευστό, παχύρρευστο ή μη, μερικώς ή ολικώς κρυσταλλωμένο.

Η κρυστάλλωση του μελιού είναι πολύπλοκο φαινόμενο. Αρχικά οφείλεται στη διαφορετική σχέση φρουκτόζης και γλυκόζης αλλά η θέρμανση σε χαμηλές θερμοκρασίες επαναφέρει το μέλι σε ρευστή του κατάσταση και έτσι εικάζεται ότι μπορεί να προκαλείται και από ένζυμα. Όταν όμως το μέλι διατηρείται για κάποιο χρονικό διάστημα τότε η κρυστάλλωση επανεμφανίζεται. Το κρυσταλλωμένο μέλι δεν έχει χάσει τίποτα από την

θρεπτική αξία και πρέπει να καταναλώνεται όπως είναι διότι η θέρμανση του για να λιώσει και να αποκτήσει την αρχική του ωραία φυσική κατάσταση οπωσδήποτε μετουσιώνει ορισμένα από τα θρεπτικά του συστατικά (Ζερφυρίδης, 1998).

1.6 Τα είδη του ελληνικού μελιού

Η Ελλάδα διακρίνεται από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές με έντονο ανάγλυφο και διαφορετική χλωρίδα. Ερευνητές, με το πέρασ πλήθος ειδών αναλύσεων, οι οποίες έχουν εφαρμοστεί και διεθνώς, αλλά και καινοτόμες, κατάφεραν να ταυτοποιήσουν και τελικώς να νομοθετηθεί η ύπαρξη αμιγών καθαρών ποικιλιών του ελληνικού μελιού.

Γνωρίζοντας, τον τρόπο παρασκευής του μελιού από τις μέλισσες, προσανατόλισαν την έρευνά τους στην Παρασκευή του μελιού από διάφορες φυτικής προελεύσεις, ολοκλήρωσαν τις φυσικοχημικές αναλύσεις σε δείγματα μελιών από διάφορες γεωγραφικές περιοχές και διαφορετικές φυτικές προελεύσεις. Η μελέτη των ελληνικών μελιών ξεκίνησε με προσδιορισμό των φυσικών ιδιοτήτων (χρώμα, οσμή, ειδικό βάρος) και των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών (υγρασία, τέφρα, ζάχαρα, οξύτητα, ηλεκτρική αγωγιμότητα, περιεκτικότητα), το ποσό γλυκόζης-φρουκτόζης και το ποσό σακχαρόζης.

Με βάση τα πιο πάνω, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ανθόμελων και των μελιών των κωνοφόρων δέντρων. Το ανθόμελο είναι

πιο ανοιχτόχρωμο, λεπτόρρευστο και αρωματικό και με την πάροδο του χρόνου σε χαμηλές θερμοκρασίες γίνεται παχύρρευστο, κρυσταλλώνει και με τον καιρό στερεοποιείται. Ακόμη, περιέχει μεγαλύτερο ποσοστό γλυκόζης και φρουκτόζης (μεγαλύτερο του 65%) και μπορεί να περιέχει υπολείμματα γύρης. Από την άλλη, το πευκόμελο είναι σκουρόχρωμο, παχύρρευστο και κρυσταλλώνει λιγότερο. Έχει μικρότερο ποσοστό σακχάρων (38%) αλλά είναι πλούσιο σε μεταλλικά ιόντα (Υφαντίδης, 1983).

Κάθε κατηγορία έχει τις δικές της ιδιομορφίες που την κάνει να ξεχωρίζει από όλες τις άλλες:

1.6.1 Πεύκο – *Pinus halepensis* (κοινό πεύκο), (παραγωγή μελιού από μελίτωμα)

Περίπου το 65% της συνολικής παραγωγής μελιού στην Ελλάδα προέρχεται από το πεύκο. Θεωρείται ως το σημαντικότερο μελισσοκομικό φυτό της χώρας. Προέρχεται από τις μελιτώδεις εκκρίσεις του εντόμου *Marchalina hellinica*, γνωστό ως «βαμβακάδα», «εργάτης», «μικρόβιο ή παράσιτο» του πεύκου. Γι' αυτό και το μέλι αυτό έχει χαρακτηριστικά μελιτώματος, όπως υψηλή συγκέντρωση τέφρας και υψηλό Ph. Το παράσιτο βρίσκεται κυρίως στη περιοχή της Θάσου, αλλά και στη Χαλκιδική, Εύβοια, Σκόπελο, Σκιάθο, Ζάκυνθο, Ρόδο, Κρήτη και άλλα.

Λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης σακχάρων που περιέχει δεν είναι ιδιαίτερα γλυκό στη γεύση. Το χρώμα του είναι πιο σκούρο από το θυμαρίσιο. Αυτό, μάλιστα, που παράγεται την άνοιξη, είναι πιο ανοιχτόχρωμο και πιο διαυγές από εκείνο που παράγεται το φθινόπωρο. Είναι πλουσιότερο από το ανθόμελο σε ιχνοστοιχεία, σε πρωτεΐνες και αμινοξέα και έχει τις λιγότερες θερμίδες. Σακχαρώνεται σχετικά αργά αφού η φυσική περιεκτικότητά του σε γλυκόζη είναι χαμηλή.

Συγκεκριμένα, τα αμιγή πευκόμελα παραμένουν ρευστά (δηλαδή χωρίς να κρυσταλλώνουν) για περισσότερο από ενάμιση χρόνο. Επιπλέον, θεωρείται μέλι υψηλής θρεπτικής αξίας και αυτό οφείλεται κυρίως στο μεγάλο αριθμό διαφορετικών ουσιών που υπάρχουν στη σύστασή του. Από τις ουσίες αυτές επικρατούν τα μέταλλα και τα ιχνοστοιχεία (ασβέστιο, μαγνήσιο, σίδηρος, χαλκός), τα οποία βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα ελληνικά πευκόμελα (Θρασυβούλου & Μανίκης, 1990).

1.6.2 Έλατο – Abies sp., (παραγωγή μελιού από μελίτωμα)

Μία από τις καλύτερες και ακριβότερες κατηγορίες μελιού. Δίνει μέλι εξαιρετικής ποιότητας από μελιτοεκκρίσεις εντόμων τον Ιούνιο. Είναι ιδιαίτερα πυκνόρρευστο. Υπολογίζεται ότι το 5-10% περίπου του μελιού που παράγεται στην Ελλάδα είναι από έλατα. Το συγκεκριμένο είδος διακρίνεται για την ιδιαίτερα καλή του γεύση, δεν παρουσιάζει έντονο άρωμα και λόγω του χαμηλού ποσοστού γλυκόζης, δεν κρυσταλλώνει. Είναι πλούσιο σε ιχνοστοιχεία (κάλιο, μαγνήσιο, σίδηρος κλπ.) και περιέχει

βιταμίνες σε πολύ μικρές ποσότητες, αλλά ακόμα και αυτή η μικρή ποσότητα βοηθάει στην καλύτερη αφομοίωση των σακχάρων από τον ανθρώπινο οργανισμό (Μπίκος, 1991).

Το ελληνικό έλατο, γνωστό ως ελάτη η Κεφαλληνική (*Abies cerhalonica*), συναντιέται μόνο στην Ελλάδα και συγκεκριμένα στην Ευρυτανία, τον Ταΰγετο, το Περούλι, την Πάρνηθα και άλλες περιοχές. Το μέλι που παράγεται είναι δυο ειδών. Το ένα, γνωστό ως βανίλια, είναι εξαιρετικά πυκνόρρευστο, δεν κρυσταλλώνει, παρουσιάζει αναλαμπές χρωμάτων και έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε ανάγοντα σάκχαρα.

Παράγεται στο Μαίναλο ή στον Πάρνωνα της Πελοποννήσου και ιδιαίτερα αυτό του Μαινάλου είναι το μοναδικό ελληνικό μέλι που έχει χαρακτηριστεί στην Ευρωπαϊκή Ένωση ως Π.Ο.Π.. Το δεύτερο είδος μοιάζει με το συνηθισμένο μέλι που παράγεται από την ευρωπαϊκή ελάτη (*Abies alba*), γνωστό ως δασόμελο.

Στα διάφορα είδη ελάτης έχουν αναφερθεί ορισμένα παράσιτα όπως τα κοκκοειδή *Physokermes hemictyphus*, *Eulecanium* και οι αφίδες *Mindarus abietinus*, *Cinara confinis*, *C. pectinatae* τα οποία παράγουν μελιτώδεις εκκρίσεις εκμεταλλεύσιμες από τις μέλισσες.

1.6.3 Βελανιδιά – *Quercus macrolepis*, (παραγωγή μελιού από μελίτωμα)

Δασικό δέντρο με εξάπλωση σε όλα την ορεινή χώρα και ενδιαφέρον από μελισσοκομική πλευρά. Κατά το μήνα Ιούλιο, δίνει μελιτώδεις εκκρίσεις. Το μέλι βελανιδιάς ή «δέντρου», όπως λέγεται από τους μελισσοκόμους έχει σκοτεινό χρώμα, γεύση ευχάριστη και κρυσταλλώνει δύσκολα. Το μέλι βελανιδιάς είναι ένα από τα πιο πλούσια μέλια σε ιχνοστοιχεία.

1.6.4 Καστανιά – *Castanea sativa*

Το μέλι καστανιάς παράγεται από το νέκταρ και τις μελιτώδεις εκκρίσεις της καστανιάς που είναι ένα αξιόλογο μελισσοκομικό δέντρο. Οι μελιτώδεις εκκρίσεις παράγονται από την αφίδα *Myzocallis castanicola*, που συναντάται στην κάτω επιφάνεια των φύλλων αλλά και πάνω στα εχινόμορφα κύπελλα που περιβάλλουν τους καρπούς. Οι εκκρίσεις αυτές αρχίζουν το Μάιο και συνεχίζονται μέχρι τον Ιούλιο (Σάντας, 1983).

Είναι αρκετά διαδεδομένο στα ορεινά μέρη της Ελλάδας και κυρίως παράγεται στη χερσόνησο του Αγίου Όρους. Η γεύση του είναι αρκετά δυνατή και ελαφρώς πικρή και σε προσμίξεις με άλλα μέλια υπερκαλύπτει τη γεύση των άλλων μελιών. Έχει έντονο άρωμα και το χρώμα του ποικίλλει ανάλογα με την προέλευση του, από ανοιχτό καφετί μέχρι σκούρο. Κρυσταλλώνει πολύ αργά, είναι ανθεκτικό στη θέρμανση και είναι πλούσιο σε ιχνοστοιχεία (κάλιο, μαγνήσιο, μαγγάνιο, βάριο). Θεωρείται ότι ευνοεί την κυκλοφορία του αίματος (Θρασυβούλου & Μανίκης, 1990).

Όλα τα μέλια καστανιάς χαρακτηρίζονται από υψηλό pH, υψηλή συγκέντρωση τέφρας, χαμηλά ανάγοντα σάκχαρα τα οποία είναι αριστερόμορφα και για αυτό κυρίως το λόγο το μέλι καστανιάς παρόλο που έχει χαρακτηριστικά μελιτώματος, κατατάσσεται στα ανθόμελα.

Έτσι θεωρείται απαραίτητη η αναγραφή στην ετικέτα της συσκευασίας η βοτανική προέλευση του μελιού είτε αυτό διατίθεται αμιγές είτε σε ανάμιξη.

Εφαρμόσθηκε το τεστ *Bonrehi & Gomez* (1988) από τους Θρασυβούλου και Μανίκη (1993) και βρέθηκε ότι το είδος της καστανιάς προτιμήθηκε και

κατατάχθηκε στην τρίτη (3^η) θέση στην Ελλάδα, με πρώτο της ελάτης, δεύτερο του πεύκου και ακολουθούν της καστανιάς, του θυμαριού, της πορτοκαλιάς, του ηλίανθου, της ερείκης και του βαμβακιού.

1.6.5 Θυμαρί – Thymus sp., (παραγωγή μελιού από νέκταρ).

Το θυμαρίσιο μέλι παράγεται κυρίως στα νησιά και σε όλη την ηπειρωτική Ελλάδα και όπου φυτρώνουν τα διάφορα είδη θυμαριού. Στη Μεσόγειο υπάρχουν 120 είδη θυμαριού, τα 12 εκ των οποίων ζουν στην Ελλάδα.

Η παραγωγή του ανέρχεται περίπου στο 10% της συνολικής παραγωγής μελιού της Ελλάδας (Θρασυβούλου & Μανίκης, 1990).

Το μέλι που παράγεται στην Ελλάδα προέρχεται κυρίως από τα είδη *Corynodothymus capitatus*, *Thymus serpyllum* και *Satureja sp.*. Φρύγανο πολύκλαδο, πυκνό, αρωματικό, μικρό, με άνθη σε πυκνές κεφαλόμορφες ταξιαρχίες. Κοινό σε ημιορεινή ζώνη και σε πετρώδεις θέσεις. Η άνθηση του φυτού γίνεται κυρίως Μάιο με Ιούνιο.

Το μέλι αυτό χαρακτηρίζεται ως ένα μέλι αρίστης ποιότητας λόγω του εξαιρετικού του αρώματος και της ευχάριστης γεύσης του. Η χαρακτηριστική του όμως αυτή γεύση μερικές φορές αφήνει μία αίσθηση καψίματος λόγω της υψηλής συγκέντρωσης σε φρουκτόζη. Έχει έντονο άρωμα, το χρώμα του είναι συνήθως ανοιχτό κεχριμπαρένιο και κρυσταλλώνει σε διάστημα 6-18 μηνών. Θεωρείται ότι έχει τονωτικές και αντισηπτικές ιδιότητες (Θρασυβούλου & Μανίκης, 1990).

1.6.6 Μέλι ανθέων, (παραγωγή μελιού από νέκταρ)

Μέλι που παράγεται την άνοιξη με την ανθοφορία της ελληνικής φύσης. Είναι ανάμεικτο και οι ιδιότητες του διαφέρουν ανάλογα με το νέκταρ των ελληνικών φυτών που προσκομίζουν στην κυψέλη οι μέλισσες. Παράγεται σε μεγάλες ποσότητες και είναι μέλι που μπορεί να παράγει ακόμη και ένας άπειρος μελισσοκόμος. Θεωρείται ως ένα κλασσικό ελληνικό μέλι που μαζί με το πευκόμελο υπερβαίνουν το 80% του ποσοστού της συνολικής ελληνικής παραγωγής. Δυστυχώς, το μέλι ανθέων δεν έχει διακριτά στοιχεία ενώ πολλοί μελισσοκόμοι και τυποποιητές το αναμειγνύουν με διάφορα μέλια τα οποία είναι ταυτοποιημένα (π.χ. βαμβακιού) χωρίς να το αναφέρουν στην συσκευασία. Το χρώμα του συνήθως είναι ανοιχτόχρωμο και η κρυστάλλωση του αν και είναι δύσκολο να προβλεφθεί, γίνεται συνήθως 4-6 μήνες μετά τη συλλογή του.

1.6.7 Μέλι εσπεριδοειδών, (παραγωγή μελιού από νέκταρ)

Τα εσπεριδοειδή (πορτοκαλιά, λεμονιά) αποτελούν μια σημαντική πηγή νέκταρος για την παραγωγή μελιού. Η πορτοκαλιά (*Citrus aurantium*) είναι ο κύριος αντιπρόσωπος των εσπεριδοειδών και αποτελεί μια σημαντική πηγή νέκταρος για την παραγωγή μελιού. Παράγεται κυρίως στην Κρήτη, στον Πόρο, στην Πελοπόννησο και στην Ήπειρο, Έχει ντελικάτη και ελαφρώς όξινη γεύση, αναδίδει το άρωμα του πορτοκαλιού και το χρώμα του είναι ανοιχτό κίτρινο, κεχριμπαρένιο. Σαν μέλι είναι αραιό, κρυσταλλώνει πολύ γρήγορα (μέσα σε 1-2 μήνες) και δεν αντέχει στις υψηλές θερμοκρασίες (Θρασυβούλου & Μανίκης, 1990).

Όλα τα μέλια εσπεριδοειδών χαρακτηρίζονται από χαμηλή συγκέντρωση προλίνης, χαμηλή διασπάση (ένζυμο που διασπά το άμυλο και χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό της νοθείας του μελιού) και από υψηλή συγκέντρωση ασβεστίου 2-7,2 mg/kg και γενικά πλούσια σε μεταλλικά στοιχεία (Δημητριάδης, 2005).

1.3.8 Ακακία – Robinia pseudoacacia, (παραγωγή μελιού από νέκταρ)

Η ακακία είναι ένα πολύ διαδεδομένο δέντρο, αυτοφυές σε χέρσα εδάφη και σε ρεματιές, αλλά και καλλωπιστικό. Το μέλι ακακίας είναι ιδιαίτερα γνωστό στην Κεντρική Ευρώπη λόγω των μεγάλων εκτάσεων ακακίας που έχουν εκεί. Στην Ελλάδα η παραγωγή του μελιού αυτού είναι πιο σταθερή λόγω των διαφορετικών ποικιλιών ακακίας που υπάρχουν. Το χρώμα του είναι ανοιχτόχρωμο και θεωρείται ως ένα μέλι ιδιαίτερα διαυγές το οποίο δύσκολα κρυσταλλώνεται.

1.3.9 Κουμαριά (*Arbutus unedo*)

Η Κουμαριά είναι θάμνος αειθαλής, φτάνει περίπου τα 3 μέτρα, αλλά μερικές γίνεται ολόκληρο δένδρο. Το μέλι της κουμαριάς, έχει χρώμα σκούρο κίτρινο, το ιξώδες του είναι μέτριο, γεύση πικρή και γι'αυτό έχει και μικρή εμπορική αξία.

Είναι πλούσιο σε ιχνοστοιχεία και βιταμίνες, κάνει καλό στον άνθρωπο και μάλιστα έχει βρεθεί ότι είναι διουρητικό και κατεβάζει την πίεση, κάνει καλό στο κυκλοφορικό άρα και στην καρδιά, αλλά και ταυτόχρονα σαν διουρητικό κάνει καλό στα νεφρά και κατ επέκταση και στον προστάτη..

1.5 Μεταγονιδιωματική ανάλυση μικροβιώματος

Για πολλά χρόνια, τα ευρήματα γύρω από το μικροβίωμα προέρχονταν μόνο από μεθόδους καλλιέργειας μικροβίων. Η καλλιέργεια αποτελεί μια χαμηλή κόστους λύση όμως είναι μια χρονοβόρα διαδικασία. Δίνει μια περιορισμένη άποψη γύρω από την ποικιλομορφία του μικροβιώματος και τα μικρόβια που βρίσκονται σε μικρούς πληθυσμούς δεν μπορούν να απομονωθούν λόγω υπερανάπτυξης των υπόλοιπων μικροβίων σε υψηλές συγκεντρώσεις. (Γύπας Φ. 2014). Γ' αυτό το λόγο χρειάστηκε η ανακάλυψη νέων τεχνικών ποιοτικής ανάλυσης του μικροβιώματος.

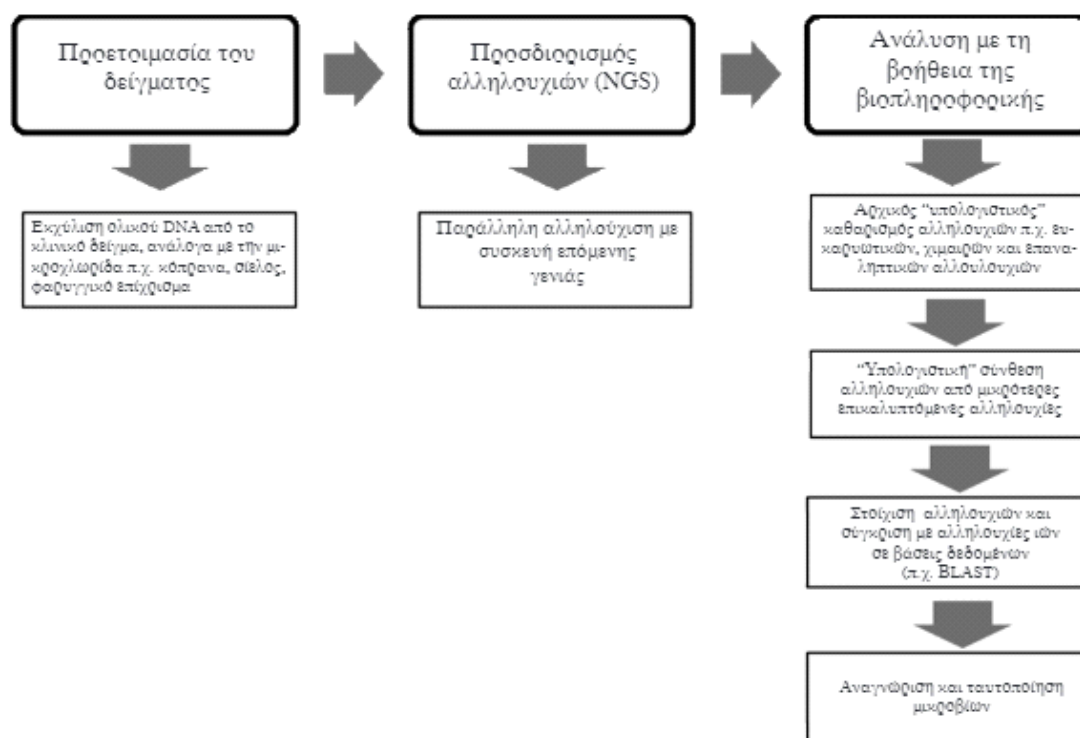
Η μεταγονιδιωματική ανάλυση είναι ένα επιστημονικό πεδίο, που με την απομόνωση DNA του δείγματος, μπορεί να γίνει μελέτη ώστε να διαπιστωθεί ποιοι μικροοργανισμοί βρίσκονται σε αυτό (Arpita Ghosh,2019). Είναι ένα ισχυρό εργαλείο που χρησιμοποιείται για την ανάλυση μικροβιακών κοινοτήτων χωρίς να πρέπει να προηγηθεί η καλλιέργεια των μικροοργανισμών στο εργαστήριο, (Asiya Nazir, 2016). Στόχος της είναι να απαντήσει ερωτήματα, όπως ποια είδη μικροβίων υπάρχουν και σε πόση αφθονία βρίσκεται το καθένα.

Το γονίδιο 16S r RNA των βακτηρίων και η ITS περιοχή των μυκήτων λόγω της υπερμεταβλητότητας που τις χαρακτηρίζει χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση βακτηρίων και μυκήτων, αντίστοιχα. Έχουν συνδράμει σε

μεγάλο βαθμό της κατανόηση σύνθεσης του μικροβιώματος και έχουν επιτρέψει την σύγκριση μεταξύ διαφόρων μικροβιωμάτων.

Η τεχνική της μεταγονιδιωματικής περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1998 από την Handelsman όταν χρησιμοποίησε τον όρο σε μία μελέτη σχετική με την χλωρίδα του εδάφους. Από τότε, έχει χρησιμοποιηθεί στην παγκόσμια προσπάθεια διερεύνησης των μικροβίων στους ωκεανούς, την μελέτη της εντερικής μικροχλωρίδας και σε μελέτες που περιλαμβάνουν το Human Microbiome Project.(Peterson, 2009)

Η μεταγονιδιωματική ανάλυση στηρίζεται στην μαζική αλληλούχιση. Αυτό είναι εφικτό με μαζική, παράλληλη αλληλούχιση είτε ολόκληρου του γονιδιώματος των μικροοργανισμών ή στοχευμένων γονιδίων (π.χ. 16S rRNA) που περιέχονται σε ένα δείγμα. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει τυχαία τμηματοποίηση του DNA, αλληλούχιση των τμημάτων DNA που προκύπτουν και την χρήση κατάλληλου λογισμικού για την σύνθεση των αλληλοκαλυπτόμενων αλληλουχιών σε μια συνεχή αλληλουχία.



Το πλεονέκτημα της, σε σχέση με άλλες τεχνικές είναι ότι εκτός από την γενετική ποικιλότητα, αποκαλύπτεται και το σύνολο των γονιδίων των μικροβίων που βρίσκονται σε αυτή και επομένως, μπορεί να εξαχθεί συμπέρασμα για την λειτουργία της μικροχλωρίδας.

Στους περιορισμούς της μεθόδου περιλαμβάνεται το κόστος, ενώ παράλληλα η διαχείριση και η ανάλυση του μεγάλου όγκου δεδομένων που προκύπτουν απαιτεί εξελιγμένα υπολογιστικά συστήματα και προγράμματα λογισμικού, καθώς και ειδικευμένο προσωπικό στη βιοπληροφορική ανάλυση, με συνέπεια να μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο σε εξειδικευμένα εργαστήρια.

1.6 Το μικροβίωμα του μελιού

Το μέλι είναι γνωστό για τις αντιμικροβιακές του ιδιότητες, ωστόσο δεν είναι στείρο από μικροοργανισμούς. Μικροοργανισμοί, που μπορούν να επιβιώσουν μέσα στο μέλι είναι ανεκτικοί στην υψηλή συγκέντρωση σακχάρων, οξύτητας και άλλων αντιμικροβιακών χαρακτηριστικών του μελιού. Οι μικροοργανισμοί που έχουν ταυτοποιηθεί στο μέλι προέρχονται είτε από την γύρη και τα λουλούδια, είτε από τον αέρα και τη σκόνη, είτε από τη μέλισσα.

Παρατηρήθηκε ότι γένη όπως *Bacillus spp*, *Micrococcus spp*, και *Saccharomyces* μπορούν να απομονωθούν από ανήλικες μέλισσες ή από προνύμφες (Sackelt).

Σύμφωνα με έρευνες (Sackelt, 1919) 1% ζύμες, 27% θετικά κατά Gram βακτήρια συμπεριλαμβανομένων *Bacillus spp*, *Streptococcus spp*, *Clostridium spp* και 70% αρνητικά κατά Gram βακτήρια όπως *Achromobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*, *E. coli* και *Pseudomonas* αποτελούν το συμβιωτικό μικροβίωμα της μέλισσας. Το γένος *Bacillus spp* είναι το πιο

διαδεδομένο ενώ έχουν επίσης απομονωθεί *Actinomycetes spp* και *Streptomyces spp*.

Τα λουλούδια και οι κυψέλες θεωρούνται κύριοι φορείς επιμόλυνσης του μελιού ενώ για τα μικρόβια στο έντερο της μέλισσας πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνη η γύρη.

Δεύτερη πηγή της βακτηριακής επιμόλυνσης του μελιού είναι οι εξωτερικοί παράγοντες όπως ο άνθρωπος, ο εξοπλισμός με τον οποίο γίνονται οι διεργασίες εξαγωγής του μελιού, η σκόνη και ο αέρας. Μύκητες μπορούν να αναπτυχθούν εύκολα στο εξοπλισμό που υπάρχει στις κυψέλες με αποτέλεσμα να επιμολυνθεί το καθαρό μέλι.

Επιπρόσθετα, στους πιθανούς τρόπους μόλυνσης του εξαγόμενου μελιού είναι ο αέρας (στο χώρο συσκευασίας του μελιού) και οι χειριστές τροφίμων.

Τα περισσότερα βακτήρια και άλλα μικρόβια δεν μπορούν να αναπτυχθούν ή να αναπαραχθούν στο μέλι, δηλαδή μένουν αδρανή και αυτό οφείλεται στην αντιβακτηριακή δραστηριότητα του μελιού. Διάφορα βακτηρίδια έχουν εντοπιστεί σε ασηπτικά συλλεγόμενο μέλι που διατηρείται στους 20 ° C. Μόνο οι μικροοργανισμοί που σχηματίζουν σπόρια μπορούν να επιβιώσουν στο μέλι σε χαμηλή θερμοκρασία. Έρευνες έχουν δείξει ότι στελέχη όπως *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringes* και σπόρια *Clostridium botulinum* εμβολιάστηκαν σε μέλι και φυλάχθηκαν στους 25 ° C. Ο πληθυσμός του *Clostridium botulinum* δεν μεταβλήθηκε για ένα χρόνο στους 4 ° C. Ωστόσο, στους 65 ° C, δεν βρέθηκαν σπόρια μετά από 5 ημέρες αποθήκευσης. Έχει παρατηρηθεί ότι εάν το μέλι αραιώνεται με νερό, υποστηρίζει την ανάπτυξη μη παθογόνων βακτηριακών στελεχών και τη θανάτωση επικίνδυνων στελεχών (White PB, 1996).

Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει συγκεντρωτικά τα είδη των βακτηρίων που εμφανίζονται στο μέλι.

Bacteria	Yeasts	Moulds
<i>Alcaligenes</i>	<i>Ascosphaera</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Achromobacter</i>	<i>Debaromyces</i>	<i>Alihia</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Hansenula</i>	<i>Bettisia alvei</i>
<i>Bacteridium</i>	<i>Lipomyces</i>	<i>Cephalosporium</i>
<i>Brevibacterium</i>	<i>Nematospora</i>	<i>Chaetomium</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>Oosporidium</i>	<i>Coniothecium</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Pichia</i>	<i>Hormiscium</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Peronsporocea</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>Peyronelia</i>
<i>Erwinia</i>	<i>Trichosporium</i>	<i>Tripasporium</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Torula</i>	<i>Uredianacea</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>Torulopsis</i>	<i>Ustilaginacea</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Zygasaccharomyces</i>	

Πίνακας 1. Οι μικροοργανισμοί που εμφανίζονται στο μέλι (Olaitan Peter B., Adeleke O. and Ola I. Honey a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. African Health Sciences 2007; (3) 159-165)

2. Σκοπός της παρούσας εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η χρήση και σύγκριση 5 διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης ολικού DNA από δείγματα μελιών έτσι ώστε να επιλεγθεί η βέλτιστη μέθοδος και στη συνέχεια μέσω της τεχνολογίας Illumina miSeq PE 300 έγινε ανάλυση του μικροβιώματος (βακτήρια, μύκητες) από ένα δείγμα ελληνικού μελιού.

3. Πειραματικό Μέρος

3.1 Δείγματα μελιών

Για την διεξαγωγή του πειράματος, συλλέχτηκαν 6 δείγματα μελιού, διαφορετικής προέλευσης, από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας (πίνακας 1). Σε κάθε δείγμα δόθηκε ένα κωδικός και λεπτομέρειες για τον τόπο προέλευσης τους .

Η συλλογή τους έγινε σε γυάλινα βάζα και η αποθήκευση τους σε σκιερό και δροσερό μέρος.

Πίνακας 2 Χαρακτηριστικά δειγμάτων μελιών

Κωδικός	Τύπος μελιού	Ημερομηνία παραγωγής	Περιοχή συγκομιδής
S1	Μέλι Ανθέων	Ιούλιος 2017	Περιοχή Ολύμπου
S2	Γλυκάνισος	2018	Εύβοια – Στερεά Ελλάδα
S3	Κουμαριά	Νοέμβριος 2018	Άγιο Όρος
S4	Καστανιά	Ιούλιος 2018	Άγιο Όρος

S5	Θυμάρι	2018	Στερεά Ελλάδα – Νομός Φωκίδας
S6	Έλατο	2018	Στερεά Ελλάδα – Νομός Φωκίδας

3.2 Υλικά

Κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

Πιπέτες

Erpedorfs

Falcons 50ml

Ζυγαριά

Φυγόκεντρος

Επωαστήρας στους 37 °C

Υδατόλουτρο στους 65 °C

Heat block στους 80°C

Γυάλινα σφαιρίδια

Φίλτρα 0,45µm

3.3 Μέθοδοι

3.3.1 Μέθοδοι εκχύλισης ολικού DNA από δείγματα μελιών

Για την εκπόνηση της συγκεκριμένης πτυχιακής, πραγματοποιήθηκαν 5 διαφορετικοί μέθοδοι απομόνωσης DNA στα 6 μέλια και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ποιοτικός έλεγχος των δειγμάτων DNA.

3.3.1^α Χρήση του πρωτοκόλου **NucleoSpin Food** από Macherey-Nagel για απομόνωση DNA από δείγματα μελιών

Προηγήθηκε ομογενοποίηση του δείγματος με γυάλινα σφαιρίδια. Σε 200mg από το ομογενοποιημένο δείγμα προστέθηκαν 500μl από το buffer CF, το οποίο είχε προθερμανθεί στους 65°C, και 10μl πρωτεΐνάση K και καλή ανάμειξη για 10s. Στην συνέχεια, το δείγμα επώαστηκε στους 65°C σε υδατόλουτρο για 30 λεπτά.

Μετά το πέρας των 30 λεπτών, έγινε φυγοκέντρηση του δείγματος στις 16000g για 10 λεπτά, έτσι ώστε να δημιουργηθεί ίζημα. Έπειτα, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε σωληνάρια τύπου errendorf 1,5ml και προστέθηκαν ίσες ποσότητες buffer C4 και αιθανόλης. Το δείγμα αναμειγνήθηκε για 30 δευτερόλεπτα. Μετά, το δείγμα τοποθετήθηκε σε στήλη Nucleospin και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11000 στροφές για 1 λεπτό.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν 3 πλύσεις με διαφορετικά buffers και 3 φυγοκεντρήσεις, αντίστοιχα. Η τελική έκλουση έγινε σε 100μl με την χρήση του buffer έκλουσης CE.

Το τελικό προϊόν αποθηκεύτηκε στους -20°C ως ότου πραγματοποιηθεί η μέθοδος PCR.

3.3.1^β Χρήση του πρωτοκόλου **Wizard** από Promega για απομόνωση DNA από δείγματα μελιών

Το πρωτόκολλο εκτελέστηκε σύμφωνα με την περιγραφή των Soares S., Amaral JS, et al, 2014 με κάποιες τροποποιήσεις.

Αρχικά, η ομογενοποίηση του μελιού πραγματοποιήθηκε με δύο ξεχωριστές διαδικασίες, ώστε να διαπιστωθεί η καλύτερη.

Πρώτη ομογενοποίηση:

Χρησιμοποιήθηκαν 50gr από κάθε μέλι τα οποία τοποθετήθηκαν σε 4 falcons των 50ml (12,5gr μελιού σε κάθε falcon) και προστέθηκαν 40 ml ddH₂O σε κάθε falcon. Έπειτα, τα δείγματα επωάστηκαν στους 40°C για 10 λεπτά.

Μετά την επώαση, έγινε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 9000g για 10 λεπτά, αποβολή υπερκλειμένου, επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 5 ml ddH₂O και ένωση των 4 falcons σε 1. Στην συνέχεια, έγινε αραίωση του δείγματος με ddH₂O μέχρι τα 45 ml και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 9000 στροφές.

Αποβολή υπερκλειμένου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 1 ml ddH₂O. Προσθήκη 20 γυάλινων σφαιριδίων (400μm) και ανακίνηση του δείγματος για 2 λεπτά. Αφαίρεση των γυάλινων σφαιριδίων και αποθήκευση του δείγματος στους -20 °C μέχρι να πραγματοποιηθεί η εκχύλιση του DNA.

Δεύτερη ομογενοποίηση:

Πραγματοποιήθηκε επώαση 3 ωρών όπως αναφέρει το άρθρο των Soares S., Amaral JS, et al, 2014. Η απομόνωση έγινε όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο του Wizard για απομόνωση Gram + και Gram – βακτηρίων. Η τελική έκλυση έγινε στα 100μl σε ddH₂O.

Το τελικό προϊόν αποθηκεύτηκε στους -20°C έως ότου πραγματοποιηθεί η μέθοδος PCR.

3.3.1^ν Χρήση πρωτοκόλου με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος CTAB (Utzeri et al. 2018)

Προηγήθηκε ομογενοποίηση των δειγμάτων, όπως ακριβώς περιγράφεται στο άρθρο, με γυάλινα σφαιρίδια. Ακολούθως, δημιουργία του ρυθμιστικού διαλύματος CTAB (2% (w/v) CTAB, 1.4 M NaCl, 100mM Tris-HCl, 20mM EDTA; pH 8).

Μετά την προσθήκη του CTAB, τα δείγματα επωάστηκαν για 1 ώρα και 30 λεπτά στους 65°C, στη συνέχεια προσθήκη χλωροφορμίου και ισοαμλικής αλκοόλης (24:1) , φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα για 15 λεπτά, μεταφορά της υδάτινης φάσης σε νέο μικροσωληνάριο τύπου eppendorf, προσθήκη ισοπροπανόλης, στη συνέχεια φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα για 15 λεπτά και τέλος προσθήκη 70% αιθανόλης, φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα για 15 λεπτά, αποβολή υπερκείμενου.

Η τελική έκλουση έγινε στα 40μl σε ddH₂O. Το τελικό προϊόν αποθηκεύτηκε στους -20°C έως ότου πραγματοποιηθεί η μέθοδος PCR.

3.3.1^ο Χρήση πρωτοκόλου με δημιουργία ρυθμιστικού διαλύματος (Jain S.A et al.2013)

50g από το καθένα το μέλι αραιώθηκε σε 100 mL αποστειρωμένου νερού και φυγοκεντρήθηκε σε 9500 g για 20 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα που περιέχει τη γύρη και άλλα συστατικά του φυτού χρησιμοποιήθηκε για εκχύλιση DNA.

Το πρωτόκολλο εκχύλισης DNA που περιγράφεται σε αυτή τη μελέτη περιλαμβάνει τρία διαφορετικά διαλύματα:

Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης:

0.35M σορβιτόλη,

0.1M TrisHCl pH 8 και

5mM EDTA pH8

Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης:

0,2M TrisHCl pH 8,

0,05M EDTA pH 8,

2M NaCl και

2% CTAB

Διάλυμα Sarcosyl: 5% (w/v) και

Ένα τελικό ρυθμιστικό διάλυμα :

0,5%(w/v) διθειώδες νάτριο,

2% (w/v) PVP-40,

41,7% (v/v) ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης,

41,7% (v / v) ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και

16% (v/v) Sarcosyl.

Το φρέσκο διάλυμα εργασίας παρασκευάστηκε πριν από την εκχύλιση του DNA και μπορεί να αποθηκευτεί για 4-5 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου.

Η τελική έκλουση έγινε στα 100μl σε ddH₂O. Το τελικό προϊόν αποθηκεύτηκε στους -20°C έως ότου πραγματοποιηθεί η μέθοδος PCR.

3.3.1^ε Εκχύλιση DNA μέσω φιλτραρίσματος με φίλτρα 0,45μm και στην συνέχεια εκχύλιση DNA μέσω του πρωτοκόλου NucleoSpin® Soil από Macherey-Nagel

Προετοιμασία του δείγματος για φιλτράρισμα: 10g από το καθένα το μέλι αραιώθηκε σε 50 mL αποστειρωμένου νερού και φυγοκεντρήθηκε σε 9500 g για 20 λεπτά.

Το υπερκείμενο μαζί με το διαλυμένο ίζημα (χωρίς τα σάκχαρα) φιλτραρίστηκε με την βοήθεια 0,45 μm φίλτρων (Millipore Filter Membrane, Organic-system, 0,45 μm, United States), έτσι ώστε να συγκρατηθούν τα μικροβιακά κύτταρα, οι μεμβράνες του φίλτρου αποστειρώθηκαν και η διήθηση διεξήχθη σε αποστειρωμένες συνθήκες. Μετά τη διήθηση, η μεμβράνη με τα μικροβιακά κύτταρα κόπηκε σε μικρά κομμάτια με τη χρήση νυστεριού και η εκχύλιση του DNA έγινε με την χρήση του πρωτοκόλου NucleoSpin® Soil.

Η τελική έκλουση έγινε στα 30μl σε EB. Το τελικό προϊόν αποθηκεύτηκε στους -20°C έως ότου πραγματοποιηθεί η μέθοδος PCR.

3.3.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης προϊόντων των εκχυλίσεων DNA με Nanodrop

Πριν την αντίδραση της PCR, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του DNA από τις απομονώσεις σύμφωνα με τα πιο πάνω πρωτόκολα. Η μέτρηση αυτή έγινε με την χρήση της συσκευής Nanodrop (στο τμήμα Ιατρικής στο εργαστήριο Βιοχημείας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας). Η συσκευή Nanodrop παρέχει την δυνατότητα μέτρησης πολύ μικρών όγκων (1μl) DNA. (Εικόνα).



Εικόνα 3 . Τα μέρη της συσκευής Nanodrop και ο τρόπος χρήσης της: Α) Ο βραχίονας που φέρει τις ακίδες μέτρησης, Β) Τοποθέτηση σταγόνας δείγματος στην ακίδα, Γ) Άνω και κάτω ακίδα μέτρησης και Δ) Καθαρισμός ακίδας (NanoDrop Technologies, Inc., 2007).

3.3.3 Ποιοτική ανάλυση απομονωμένου DNA μέσω ενίσχυσης των V3-V4 περιοχών του 16S r RNA μέσω της PCR

Μετά τη μέτρηση της συγκέντρωσης του ολικού DNA με το Nanodrop, ακολούθησε ενίσχυση και αξιολόγηση της ποιότητας του βακτηριακού DNA με PCR.

Πραγματοποιήθηκε ενίσχυση της περιοχής V3-V4 του γονιδίου 16S rRNA (Klindworth et al., 2013), με τους εκκινητές

341_F = CCTACGGGNGGCWGCAG και

806_R = GACTACHVGGGTATCTAATCC

Το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων ήταν περίπου 460bp.

Το μείγμα της PCR πραγματοποιήθηκε σε 20 μl περιείχε:

2 μl δείγματος απομονωμένου DNA.

2μl KAPA 10x buffer,

0,5μl dNTPS 10 mM,

0.5 μM από τον εκκινητή 341F,

0.5 μM από τον εκκινητή 806R,

2,5U από την KAPA πολυμεράση και

αποστειρωμένο νερό μέχρι τα 20 μl.

Επιπρόσθετα, στην αντίδραση έλαβαν χώρα ένας θετικός (DNA μυκοπλάσματος) και ένας αρνητικός μάρτυρας.

Η αρχική αποδιάταξη πραγματοποιήθηκε στους 95°C για 3 λεπτά.

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα για την πραγματοποίηση της αντίδρασης ήταν:

αποδιάταξη στους 95°C για 30sec,

υβριδισμός των εκκινητών με την αλληλουχία-στόχο στους 55°C για 30sec,

σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων του DNA με επέκταση του 3' άκρου των εκκινητών με τη βοήθεια του ενζύμου KAPA στους 72°C για 30sec.

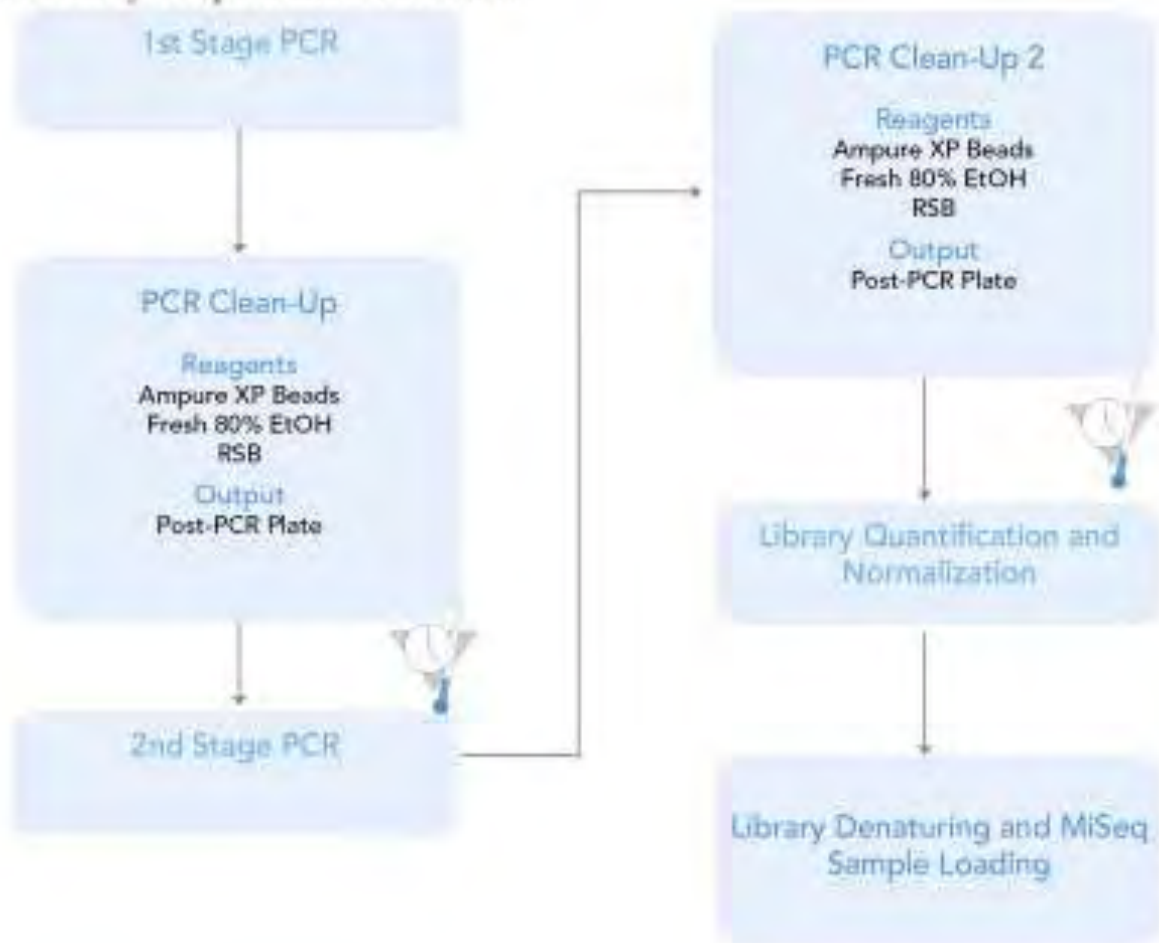
Τα πιο πάνω στάδια επαναλήφθηκαν για 40 κύκλους και ακολουθούσε ένα ακόμα στάδιο τελικής επιμήκυνσης του DNA στους 72°C για 5min.

3.3.4 Αλληλούχηση DNA επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing – NGS) για την μελέτη του μικροβιώματος των μελίων

Το δείγμα S6 (μέλι ελάτου) στάλθηκε στην εταιρία MacroGen Inc, όπου εκεί έγινε επανέλεγχος της ποιότητας των δειγμάτων, κατασκευή βιβλιοθηκών τόσο για βακτήρια, όσο και για μύκητες του κάθε δείγματος, αλληλούχηση με Illumina MiSeq PE 300 ενώ η ανάλυση και σύγκριση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με την συμβολή του εργαστηρίου Βιοπληροφορικής στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Το πιο κάτω διάγραμμα παρουσιάζει τη ροή των γεγονότων για την προετοιμασία της βιβλιοθήκης από την MacroGen Inc.:

16S Library Preparation Workflow



Πρώτης φάσης PCR:

Κάθε αμπλικόνιο δημιουργήθηκε χρησιμοποιώντας 12,5ng υλικού έναρξης σε μία αντίδραση των 25 μl που περιείχε 12,5 μl από 2x KAPA HiFi HotStart Ready Mix και εκκινητές σε τελική συγκέντρωση 1 μM. Πραγματοποιήθηκε ένα αρχικό στάδιο μετουσίωσης 3 λεπτών στους 95 ° C. Ακολουθήθηκε από 30 κύκλους των 95 ° C για 30 δευτερόλεπτα, των 55 ° C για 30 δευτερόλεπτα και των 72 ° C για 30 δευτερόλεπτα και για την τελική επιμύκηση για 5 λεπτά στο 72° C.

Στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ υπάρχουν περισσότερες πληροφορίες όσων αφορά των προετοιμασία των βιβλιοθηκών και την αλληλούχιση της επόμενης γενιάς.

3.4 Βιοπληροφορική ανάλυση:

Για την ανάλυση του μικροβιώματος, χρησιμοποιήθηκαν τα fastq αρχεία όπως λήφθηκαν από την ιστοσελίδα της Macrogen Co., τόσο για το forward read όσο και το reverse και όλη η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο λογισμικό Qiime2 (ο αριθμός των read στην αρχή για κάθε αρχείο φαίνεται στον πίνακα 3 στα αποτελέσματα).

Αρχικά χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος DADA από το συγκεκριμένο λογισμικό για να γίνει αφαίρεση του θορύβου και να φιλτραριστούν τα χειμερικά μόρια. Στα βακτήρια στο συγκεκριμένο στάδιο τα reads από τα βακτηριακά fastq αρχεία κόπηκαν σε μέγεθος 290nt και 220nt για το forward και το reverse αντίστοιχα, ενώ στους μύκητες χρησιμοποιήθηκαν ως σημεία κοπής τα μήκη 240nt και 180nt αντίστοιχα, καθώς μετά τα προαναφερθέντα μήκη τα read ήταν “κακής ποιότητας”.

Για το φιλτράρισμα των χειμερικών μορίων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της συναίνεσης (consensus). Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν πρότυπες

γνωστές αλληλουχίες από τις βάσεις δεδομένων SILVA (για το 16S rRNA) και τη βάση δεδομένων UNITE (ITS αλληλουχίες) ως σημείο αναφοράς για την εύρεση της ταξινόμησης των οργανισμών που περιέχονταν μέσα σε κάθε δείγμα. Οι αλληλουχίες που συναρμολογήθηκαν για τα διάφορα δείγματα ελέγχθηκαν μέσω του αλγορίθμου vsearch έναντι των γνωστών αλληλουχιών για την εύρεση της ταξινόμησης τους. Μέσω των αποτελεσμάτων δημιουργήθηκαν τα γραφήματα bar-plots.

4. Αποτελέσματα

4.1 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης προϊόντων των εκχυλίσεων DNA με Nanodrop

Μετά την εκχύλιση του DNA με τις διαφορετικές μεθόδους που προαναφέρθηκαν, έγινε ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων του ολικού DNA που απομονώθηκε από κάθε δείγμα με την βοήθεια του Nanodrop. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πιο κάτω πίνακα.

Πίνακας 3 Προσδιορισμός του ολικού DNA των εκχυλίσεων με Nanodrop

Μέθοδοι εκχύλισης DNA μελιών (ng/μl)					
Μέλια	Nucleospin Food	Wizard	CTAB/χλωροφόρμιο	CTAB/χλωροφόρμιο (πείραμα 3 ημερών)	Φιλτράρισμα & Nucleospin Soil
S1	1.8	49.5	110.5	1.3	2.1
S2	1.3	10.5	8.6	1.2	3.2
S3	0.5	6.8	6.3	2.3	5
S4	0.6	42.6	7.8	2.8	1.8
S5	1.9	6.9	6.5	3.6	3.4
S6	1.5	6	4.6	3.2	2.6

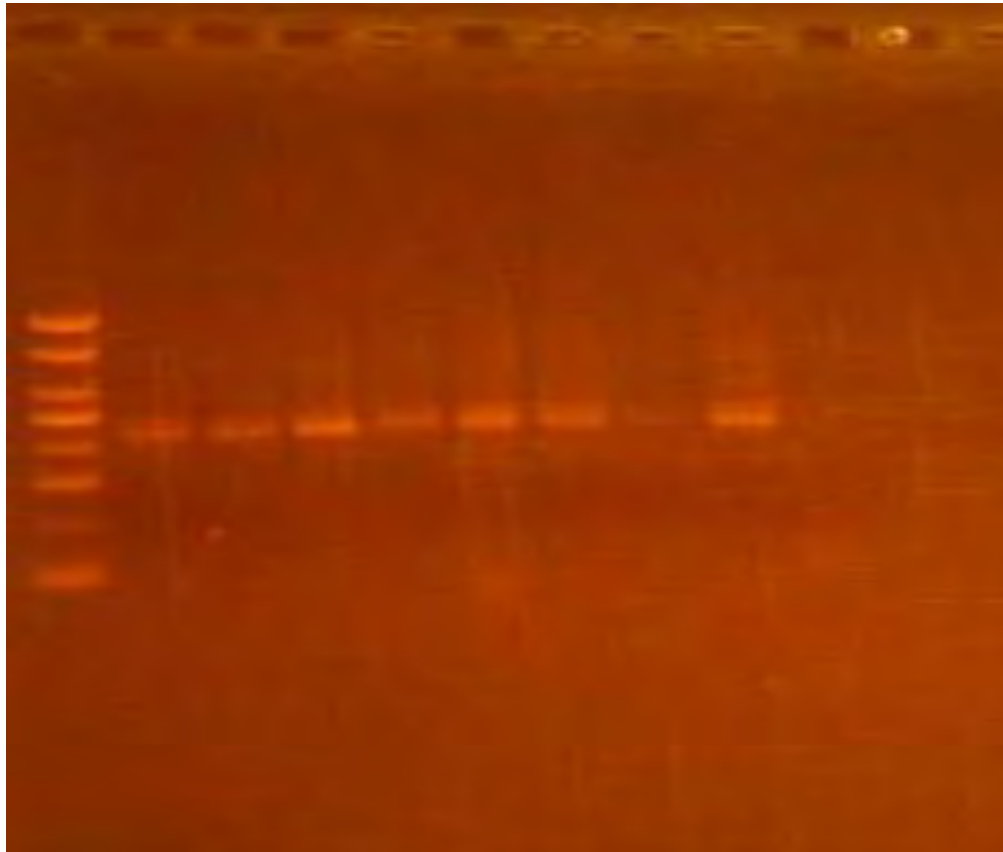
Από τον πιο πάνω πίνακα, είναι εμφανές ότι οι μέθοδοι που δούλεψαν καλύτερα είναι οι **Wizard** και **CTAB / χλωροφόρμιο**, ενώ οι υπόλοιπες μέθοδοι έδειξαν πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις DNA. Η μέθοδος η οποία δούλεψε καλύτερα σε όλα τα δείγματα είναι η **Wizard**, εκτός από το δείγμα S1 που φαίνεται πως η μέθοδος **CTAB / χλωροφόρμιο** παράγει καλύτερα αποτελέσματα.

4.2 Αποτελέσματα ποιοτικού ελέγχου ολικού DNA μέσω ενίσχυσης των V3-V4 περιοχών του 16S r RNA

Ακολούθως το DNA ελέγχθηκε για την ακεραιότητα του και διαπιστώθηκε αν μπορεί να ενισχυθεί το DNA των βακτηρίων με κατάλληλους εκκινητές. (ποιοτικός έλεγχος)

Στη συνέχεια 10μl από τα προϊόντα της PCR έτρεξαν σε τζελ αγαρόζης 1% και τα αποτελέσματα έγιναν ορατά σε φως UV. Τα αποτελέσματα φαίνονται στις πιο κάτω εικόνες.

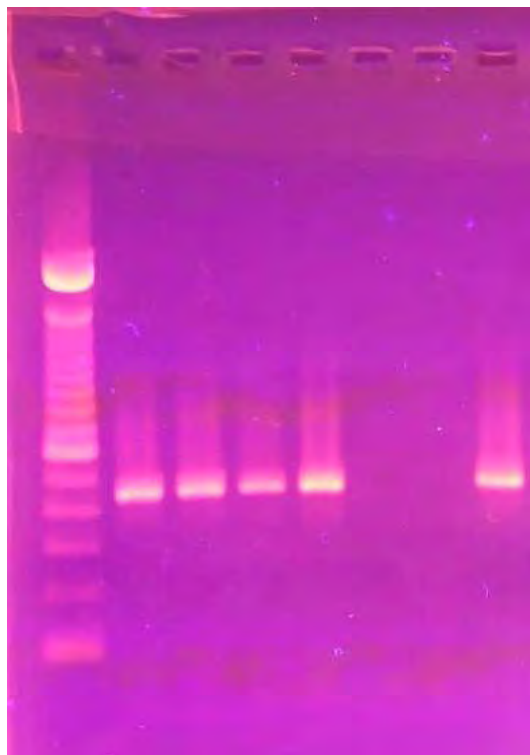
Wizard:



Εικόνα 4. Ηλεκτροφόρηση πήκτης αгарόζης από προϊόντα της PCR από την ενίσχυση της περιοχής V3-V4 του 16S ριβοσωμικού RNA των εκχυλίσμων DNA που προετοιμάστηκαν με την μέθοδο Wizard. Με σειρά από αριστερά προς τα δεξιά: ladder 100 βάσεων, S1, S2, S3, S4, S5, S6, Αρνητικός μάρτυρας, Θετικός μάρτυρας

Όπως φαίνεται και στην πιο πάνω εικόνα, και στα 6 δείγματα υπάρχει βακτηριακό DNA, καθώς υπάρχει μια μπάντα ανάμεσα στις 400 και 500 βάσεις του ladder (περίπου 460 βάσεις). Συνεπώς, η μέθοδος Wizard είναι μια καλή μέθοδος για την απομόνωση βακτηριακού DNA από τα μέλια.

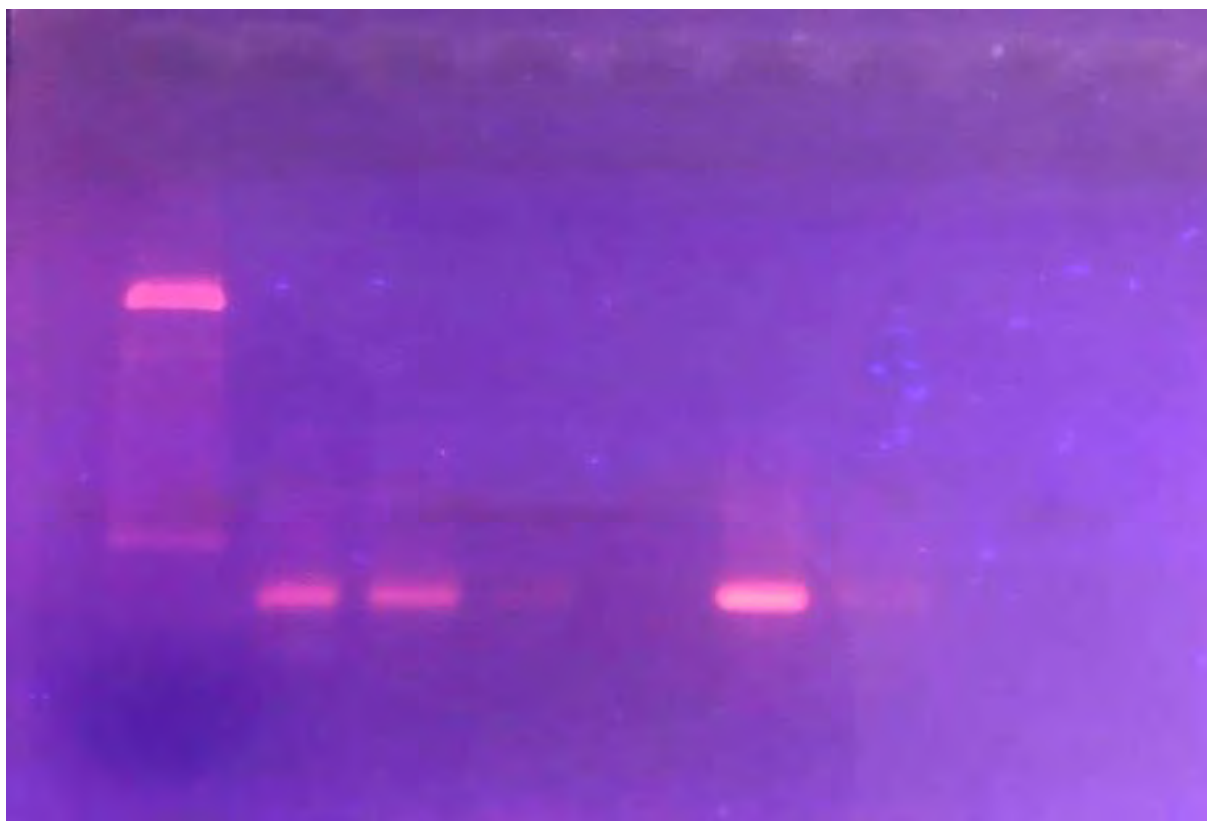
CTAB / χλωροφόρμιο:



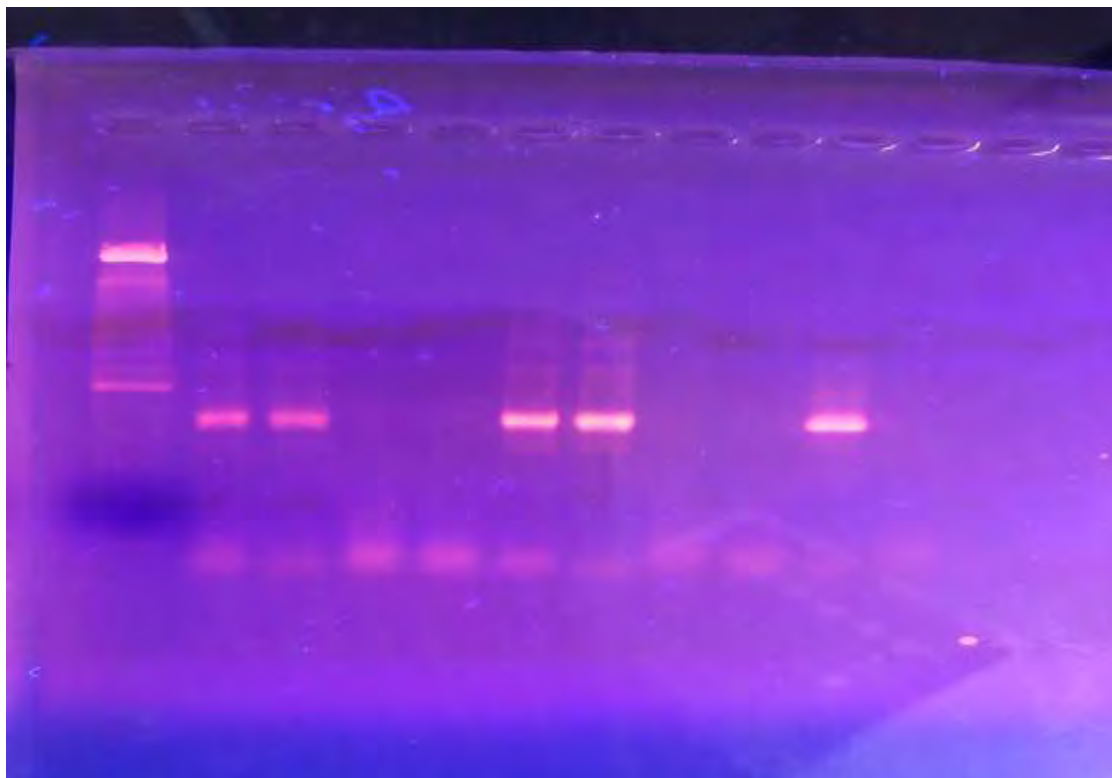
Εικόνα 5 . Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αгарόζης από προϊόντα της PCR από την ενίσχυση της περιοχής V3-V4 του 16S ριβοσωμικού RNA των εκχυλίσεων DNA που προετοιμάστηκαν με την μέθοδο CTAB / χλωροφόρμιο. Με σειρά από αριστερά προς τα δεξιά: ladder 100 βάσεων, S1 (1μl), S1, S5, S6 (1μl) , S6 , Αρνητικός μάρτυρας, Θετικός μάρτυρας

Πιο πάνω φαίνεται ότι και στα 3 δείγματα δούλεψε η PCR, άρα σε όλα υπάρχει ακέραιο βακτηριακό DNA μετά την απομόνωση ολικού DNA με την μέθοδο

CTAB / χλωροφόρμιο. Ωστόσο, για τα δείγματα S3, S4 και S5 φαίνεται ότι η συγκεκριμένη μέθοδος δεν έδωσε αποτελέσματα και αυτό διακρίνεται στις πιο κάτω εικόνες όπου γίνεται σύγκριση ανάμεσα στις μεθόδους Wizard και CTAB / χλωροφόρμιο.



Εικόνα 6 . **Μέλι από Γλυκάνισο (S2)**: Ηλεκτροφόρηση πήκτωμα αγαρόζης από προϊόντα της PCR από την ενίσχυση της περιοχής V3-V4 του 16S ριβοσωμικού RNA των εκχυλίσμων DNA που προετοιμάστηκαν με την μέθοδο Wizard (πηγαδάκια 1 και 2) και με την μέθοδο CTAB / χλωροφόρμιο (πηγαδάκια 3 και 4). Με σειρά από αριστερά προς τα δεξιά: ladder 100 βάσεων, S2 (1μl), S2(2μl), S2(1μl) και S2 (2μl), Θετικός μάρτυρας, Αρνητικός μάρτυρας



Εικόνα 7 . **Μέλια από Κουμαρία (S3) και Καστανιά (S4):** Ηλεκτροφόρηση πήκτης αгарόζης από προϊόντα της PCR από την ενίσχυση της περιοχής V3-V4 του 16S ριβοσωμικού RNA των εκχυλίσμων DNA που προετοιμάστηκαν με την μέθοδο Wizard (πηγαδάκια 1, 2, 5 και 6) και με την μέθοδο CTAB / χλωροφόρμιο (πηγαδάκια 3,4,7και 8). Με σειρά από αριστερά προς τα δεξιά: ladder 100 βάσεων, S2 (1μl), S3(2μl), S3(1μl), S3 (2μl), S4 (1μl), S4(PCR με DNA template 2μl), S4(1μl) και S4 (2μl), Θετικός μάρτυρας, Αρνητικός μάρτυρας

CTAB/ χλωροφόρμιο (πείραμα 3 ημερών) και Φιλτράρισμα & Nucleospin Soil:

Οι 2 τελευταίες μέθοδοι όταν πραγματοποιήθηκε η ποσοτικοποίηση DNA ήταν αυτές που έδειξαν τις πιο χαμηλές συγκεντρώσεις. Παρόλα αυτά έγινε ενίσχυση του τμήματος του 16S ριβοσωμικού RNA με PCR,έτσι ώστε να εξακριβωθεί αν υπάρχει βακτηριακό DNA στα δείγματα ακόμα και σε τόσο μικρές συγκεντρώσεις DNA.

4.3 Αποτελέσματα μεταγονιδιωματικής ανάλυσης

Δείγμα 6 (S6) – προέλευση Έλατο:

Όλη η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο λογισμικό Qiime2 (ο αριθμός των read στην αρχή για κάθε αρχείο φαίνεται στον πίνακα 3).

Bacteria_Sample 6	183691
Fungi_Sample 6	161367

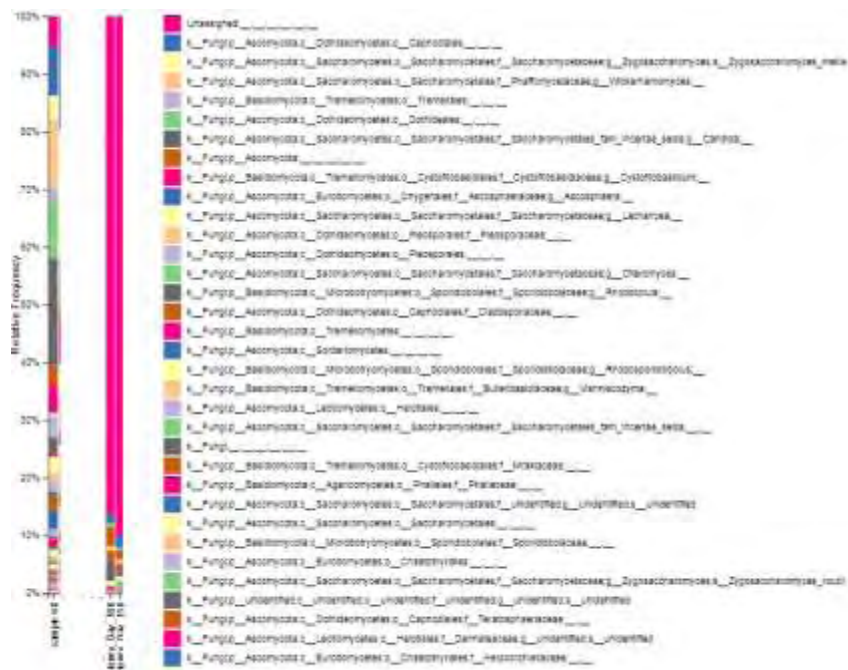
Πίνακας 3. Τα reads που χρησιμοποιήθηκαν για το δείγμα 6 (βακτήρια και μύκητες)

Στο βακτηριακό μικροβίωμα του δείγματος 6 (S6) κυριαρχούν τα *Lactobacillus spp*, *Sphingomonas*, *Bacillus spp*, *Pseudomonas* και *Acetobacter* με ποσοστά 82, 5, 1, 1, 1% αντίστοιχα. Ενώ στους μύκητες, επικρατούν οι φυλότυποι *Candida*, *Dothideales*, *Wickerhamomyces*, *Capnoidiales* και *Zygosaccharomyces mellis* με ποσοστά 18, 10, 12 και 9%, αντίστοιχα. Συγκριτικά, με το μέλι Vitex που παράγεται στη Κίνα (προέλευση – θάμνος Vitex) όπου έχει γίνει ανάλογη μεταγονιδιωματική ανάλυση παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στο βακτηριακό αλλά και το μυκητιακό μικροβίωμα.



Εικόνα 8. Ταυτοποίηση Βακτηρίων για το μέλι Vitex (1 και 2) και για το ελληνικό μέλι (3) σε μορφή barplots.

Για παράδειγμα, το βακτηριακό μικροβίωμα του μελιού Vitex τα επικρατή βακτήρια είναι τα είδη *Bacillus spp*, *Lactococcus spp*, *Oceanobacillus*, *Enterococcus* και *Pseudomonas* σε ποσοστά 67 , 11 ,4, 4 και 1% , αντίστοιχα. Η μεγαλύτερη διαφορά φαίνεται να είναι στα ποσοστά του *Lactobacillus spp*, όπου στο ελατίσιο μέλι βρίσκεται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 82%, ενώ στο μέλι Vitex σε ποσοστό μικρότερο του 1%. 50



Εικόνα 9. Ταυτοποίηση μυκήτων για το μέλι Vitex (2 και 3) και για το ελληνικό μέλι (1) σε μορφή barplots.

Παρομοίως, το προφίλ των μυκήτων στο μέλι Vitex επικρατούν οι φιλότυποι *Metschokowia* , *Aurobasidium* , *Phoma* , *Candida* και *Cladosporium* με ποσοστά 96, 4 , 3 , 2 και 1%, αντίστοιχα. Η μεταγονιδιωματική ανάλυση του μελιού Vitex πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (5 ημερών , 10 ημερών και 15 ημερών) όπου εμφανίζεται σημαντική μείωση στα ποσοστά των μυκήτων όσο περνούν οι μέρες).

Το μόνο σίγουρο είναι ότι το μικροβίωμα στο μέλι συντίθεται από ποικίλους παράγοντες. Τα είδη *Bacillus* spp , *Lactobacillus*, *Enterococcus* spp και *Pseudomonas* συναντώνται στις πεπτικές οδούς της μέλισσας. Τα είδη *Bacillus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas* και *Oceanobacillus* προέρχονται από τα λουλούδια και το περιβάλλον. Ενώ οι διάφορες ζύμες που καταφέρνουν να επιβιώσουν σε ένα τόσο υψηλά ωσμωτικά περιβάλλον προέρχονται είτε από το περιβάλλον, είτε από ανθρώπινους χειρισμούς.

Αξιοσημείωτη παρατήρηση είναι το υψηλό ποσοστό του *Lactobacillus* στο ελληνικό μέλι. Οι λακτοβάκυλλοι είναι θετικά κατά Gram, προαιρετικά αναερόβια ή μικροαερόφιλα βακτήρια, σε σχήμα ράβδου και δεν σχηματίζουν σπόρια. Είναι ένα σημαντικό μέρος της ομάδας βακτηρίων γαλακτικού οξέος (δηλ.μετατρέπουν τα σάκχαρα σε γαλακτικό οξύ). Στον άνθρωπο, αποτελούν σημαντικό συστατικό της μικροβιακής μάζας σε διάφορες θέσεις του σώματος, όπως το πεπτικό σύστημα, το ουροποιητικό σύστημα και το γεννητικό σύστημα. Στις γυναίκες της ευρωπαϊκής καταγωγής, τα είδη *Lactobacillus* είναι συνήθως ένα σημαντικό μέρος της κολπικής μικροχλωρίδας. Παρουσιάζει ευεργετική σχέση με το ανθρώπινο σώμα καθώς προστατεύει τον ξενιστή από πιθανές εισβολές από παθογόνα.Είναι το συνηθέστερο προβιοτικό που βρίσκεται σε τρόφιμα όπως το γιαούρτι και μπορεί να βοηθήσει στη θεραπεία της διάρροιας, των κολπικών λοιμώξεων και των δερματικών διαταραχών όπως το έκζεμα.

Συζήτηση:

Το μέλι είναι γνωστό για τις αντιμικροβιακές του ιδιότητες, ωστόσο δεν είναι στείρο από μικροοργανισμούς. Οι μικροοργανισμοί, που μπορούν να επιβιώσουν μέσα στο μέλι είναι ανεκτικοί στην υψηλή συγκέντρωση σακχάρων, οξύτητας και άλλων αντιμικροβιακών χαρακτηριστικών του μελιού. Οι μικροοργανισμοί που έχουν ταυτοποιηθεί στο μέλι προέρχονται είτε από την γύρη και τα λουλούδια, είτε από τον αέρα και τη σκόνη, είτε από τη μέλισσα.

Σε αυτή τη διπλωματική εργασία, έγινε σύγκριση 5 διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης DNA από μέλι. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε ποσοτικός έλεγχος μέσω του Nanodrop και ποιοτικός έλεγχος των δειγμάτων μέσω ενίσχυσης των περιοχών V3 – V4 του 16S r RNA. Η μέθοδος **Wizard μαζί με την πρώτη ομογενοποίηση** φαίνεται να είναι η καλύτερη όσον αφορά τον ποσοτικό και τον ποιοτικό έλεγχο. Μόνο για ένα δείγμα (S1), φαίνεται ότι η μέθοδος **CTAB / χλωροφόρμιο** δούλεψε καλύτερα από την Wizard.

Το DNA του δείγματος S6 (μέλι ελάτου) στάλθηκε στην εταιρία MacroGen Inc, όπου εκεί έγινε επανέλεγχος της ποιότητας των δειγμάτων, κατασκευή βιβλιοθηκών τόσο για βακτήρια, όσο και για μύκητες του κάθε δείγματος, αλληλούχιση με Illumina MiSeq PE 300 ενώ η ανάλυση και σύγκριση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε από το εργαστήριο Βιοπληροφορικής στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Για την ανάλυση του μικροβιώματος, χρησιμοποιήθηκαν τα fastq αρχεία όπως λήφθηκαν από την ιστοσελίδα της MacroGen Co., τόσο για το forward read όσο και το reverse και όλη η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο λογισμικό Qiime2.

Αξιοσημείωτη διαφορά παρατηρείται στην αφθονία του *Bacillus spp.* Δηλαδή, το μέλι Vitex επικρατεί με ποσοστό 67%, σε αντίθεση με το ελληνικό μέλι που το ποσοστό του δεν ξεπερνάει το 1%. *Η σημαντικότερη διαφορά παρατηρείται στα ακραία ποσοστά του γένους Lactobacillus. Στο*

ελληνικό μέλι από έλατο συναντάται στο υψηλότερο ποσοστό βακτηρίων (82%), σε αντίθεση με το μέλι Vitex που συναντάται σε ποσοστό μικρότερο του 1% (0.6%).

Ακόμη μια σημαντική παρατήρηση είναι η αφθονία του γένους *Candida* που παρατηρείται και στο ελληνικό μέλι με ποσοστό 18% και υποδηλώνει σημαντική ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων.

Η παρουσία λακτοβακκίων στο μικροβίωμα του ελληνικού μελιού είναι πιθανό να προέρχεται μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα της μέλισσας καθώς είναι γνωστό ότι ανήκει στο μικροβίωμα της . Λακτοβάκκίλους συναντάμε και στο μικροβίωμα του ανθρώπου και είναι το συνηθέστερο προβιοτικό. *Απαιτείται περαιτέρω μελέτη, έτσι ώστε να διαπιστωθεί το προβιοτικό δυναμικό των λακτοβακκίων του ελληνικού μελιού καθώς και ταυτοποίηση των ειδών Candida που μπορεί να είναι εν δυνάμει παθογόνα.*

Ελληνική:

Γύπας Φ και Μεντής Α.Φ. Τεχνικές μελέτης των φυσιολογικών μικροχλωρίδων του ανθρώπου – Μεταγονιδιατική (2014) Ανθρώπινο Μικροβίωμα και Μεταγονιδιατική σελ 8 -13

Δερματόπουλος Β.(1949) Βασικές γνώσεις σύγχρονης μελισσοκομίας. Έκδοση Μελισσοκομικού Συνεταιρισμού Θεσσαλονίκης. σελ. 40-41.

Δημητριάδης Κ. (2005). Μελίαμα. Περιοδική έκδοση επιστημονικού κέντρου μελισσοθεραπείας. Τεύχος 3. Φθινόπωρο-Χειμώνας 2005-2006. Σελ 14.

Ζερφυρίδης, Γ. (1998). Διατροφή του Ανθρώπου. Τέταρτη Έκδοση. Εκδόσεις Γιαχούδη. Θεσσαλονίκη, Ελλάδα.

Θρασυβούλου Α. και Μανίκης Ι.(1990) Κατηγορίες Ελληνικού μελιού Μελισσοκομική Επιθεώρηση 4 (6): 158-160.

Θρασυβούλου Α. και Μανίκης Ι.(1993) Η ταυτότητα του ελληνικού μελιού. Πρακτικά ημερίδας: Το μέλι. Δυνατότητες Πληρέστερης Εκμετάλλευσης της μέλισσας. Γερακινή Χαλκιδικής, 2 Οκτωβρίου, 1992. Γεωτεχνικό Επιμελητήριο Ελλάδας. Σελ 121-132.

Θρασυβούλου Ανδρέας, 2001 Πρακτική μελισσοκομία Θεσσαλονίκη pg.11-12, 25-26, 149-195.

Καϊλίδης Σ.Δ. (1965) *Monophlebus hellenicus* (=Marchalina hellenica) Genn, Το μελισσοτροφικό έντομο της πεύκης, Δασικά χρονικά 81/82 (7-8): 1-16

Μπίκος Θ. (1991) Όλα για το μέλι. Έκδοση του ιδίου. σελ. 263-270.

- Νικολόπουλος Α., Τεντολούρης Ν., Κωστάκη Μ., Κατσιλάμπρος Ν., 2006
Λοιμώξεις στο διαβητικό πόδι Archives of Hellenic Medicine 23(3):222-232
- Σταθόπουλος Κ. (1993) Υγιεινή και διατροφική αξία του μελιού. Πρακτικά
εκδήλωσης της επιτροπής προώθησης του Ελληνικού μελιού. Αθήνα
- Τσέλλιος Δ. και Θρασυβούλου Α. (1989) Μελισσοκομικοί χειρισμοί και
μελισσοκομικά φυτά 2(7-8): 208-210
- Τυπάλδος – Ξυδιάς Α, 1979 Θάσος και Κασσάνδρα: οι μεγαλύτερες
μελισσοκομικές περιφέρειες της Ελλάδας, Μελισσοκομική Ελλάς (29): 105-
111
- Υφαντίδης Μ. (1983) Μελισσοκομία, επιστήμη και εφαρμογή. Εκδόσεις
Τσολακοπούλου, Θεσσαλονίκη. σελ. 56-67.
- Υφαντίδης Δ. Μιχαήλ (2005) Η σύγχρονη μελισσοκομία ως επιστήμη και
πράξη pg.505-515
- Χαριζάνης Π. (1989) Ευκάλυπτος, το δέντρο που υπόσχεται πολλά στη
μελισσοκομία, Μελισσοκομική Επιθεώρηση 3(3) 69-71
- Χαριζάνης Π. (1996β) Ευκάλυπτος: ένα δέντρο με πολλά πλεονεκτήματα
αλλά και μειονεκτήματα, Μελισσοκομική Επιθεώρηση 10 (12) 487-489

Ξενόγλωσση:

Al Somai N, Coley KE, Molan PC, Hancock BM. Susceptibility of *Helicobacter pylori* to the antibacterial activity of Manuka Honey. Russian Medical Journal. 1994;87:9–12.

El-leithy MA, El-sibael KB. Role of microorganisms isolated from bees, its ripening and fermentation of honey. Egyptian Journal of Microbiology. 1992;75:679–681.

Gilliam M, Prest DB. Microbiology of Lanial honey bee (*Apis mellifera*) Journal of Invertebrate Pathology. 1987;49:70–75.

Olaitan Peter B., Adeleke O. and Ola I. Honey a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. African Health Sciences 2007; (3) 159-165

Jain S.A, Marchionno G.M et al, Extraction of DNA from Honey and its amplification by PCR for botanical identification , Food Science and Technology, vol.33, no. 4

Lee CY, Kime RW. The use of honey for clarifying apple juice. J Apic Res. 1984;23(1):45–49.

Root AL. The ABC and XYZ of bee culture. London: Edward Arnold publication Ltd.; 1993. pp. 5–28.

Riesenfeld S.C, Schloss D.P, Handelsman , Metagenomics: Genomic

Analysis of Microbial Communities , Annual Review Genetics, 38: 525 - 52

Sackelt WG. Honey Colorado State Univ. as a carrier of intestinal diseases. Bull CExp Stad.1919;252:1–18

Soares S, Amaral J.S , Mafra I et al, Improving DNA isolation from honey for the botanical origin identification, Food Control, 2015, 130-136

Tysset C, De Rantline de la Roy Durand C. Contribution to the study of intestinal microbial infection of healthy honeybees: Inventory of bacterial population by negative organisms. Philadelphia: Department of Agriculture, SEA-AR, Eastern region research centres; 1991. pp. 21–55.

Utzeri V.J , Ribani A., Schiavo G. et al, Application of next generation semiconductor based sequencing to detect the botanical composition of monofloral, polyfloral and honeydew honey , Food Control , 2018, p 342-349

Alice Valentini, Christian Miquel and Pierre Taberlet, DNA barcoding for Honey biodiversity , Diversity , 2010, 610 – 617

Wen Y. Wang L, Jinzhen Y.J et al, The microbial Community Dynamics during the Vitex Honey Ripening Process in the HoneyComb, Frontiers in Microbiology, 2017 vol. 8, article 1649

White PB. The normal flora of the bee. Ashinton AC: Agricultural research service. US Department of Agriculture; 1996. pp. 301–309

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ :

Προετοιμασία βιβλιοθηκών και αλληλούχιση επόμενης γενιάς από την MACROGEN INC.

16S Metagenomic Sequencing Library Preparation

Preparing 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System

Introduction

Metagenomic studies are commonly performed by analyzing the prokaryotic 16S ribosomal RNA gene (16S rRNA), which is approximately 1,500 bp long and contains nine variable regions interspersed between conserved regions. Variable regions of 16S rRNA are frequently used in phylogenetic classifications such as genus or species in diverse microbial populations.

Which 16S rRNA region to sequence is an area of debate, and your region of interest might vary depending on things such as experimental objectives, design, and sample type. This protocol describes a method for preparing samples for sequencing the variable V3 and V4 regions of the 16S rRNA gene. This protocol can also be used for sequencing other regions with different region-specific primers. This protocol combined with a benchtop sequencing system, on-board primary analysis, and secondary analysis using MiSeq Reporter or BaseSpace, provides a comprehensive workflow for 16S rRNA amplicon sequencing.

Workflow Summary:

- 2 Order amplicon primers—The protocol includes the primer pair sequences for the V3 and V4 region that create a single amplicon of approximately ~460 bp. The protocol also includes overhang adapter sequences that must be appended to the primer pair sequences for compatibility with Illumina index and sequencing adapters. Illumina does not sell these primers. They must be ordered from a third party. See [Amplicon Primers, on page 3](#) for more information on amplicon primers.
- 3 Prepare library—The protocol describes the steps to amplify the V3 and V4 region and using a limited cycle PCR, add Illumina sequencing adapters and dual-index barcodes to the amplicon target. Using the full complement of Nextera XT indices, up to 96 libraries can be pooled together for sequencing.

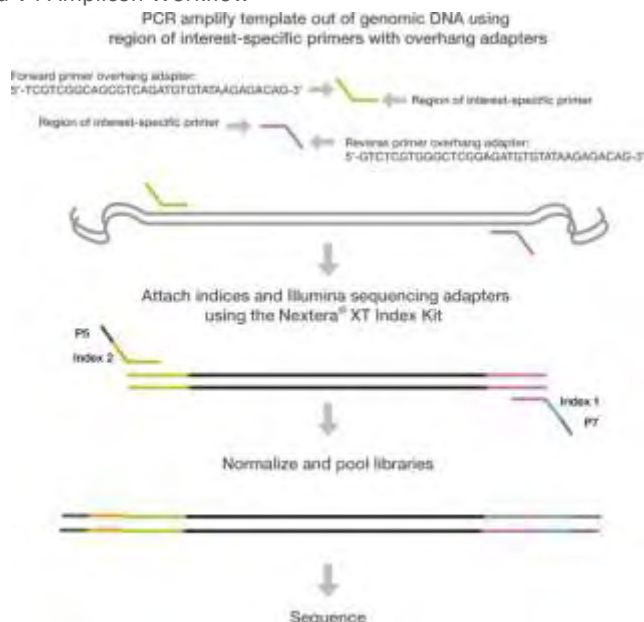
- 4 Sequence on MiSeq—Using paired 300-bp reads, and MiSeq v3 reagents, the ends of each read are overlapped to generate high-quality, full-length reads of the V3 and V4 region in a single 65-hour run. The MiSeq run output is approximately > 20 million reads and, assuming 96 indexed samples, can generate > 100,000 reads per sample, commonly recognized as sufficient for metagenomic surveys.
- 5 Analyze on MSR or BaseSpace—The Metagenomics workflow is a secondary analysis option built into the MiSeq Reporter (on-system software) or available on BaseSpace (cloud-based software). The Metagenomics Workflow performs a taxonomic classification using the Greengenes database showing genus or species level classification in a graphical format.

This protocol can be used to sequence alternative regions of the 16S rRNA gene and for other targeted amplicon sequences of interest. When using this protocol for amplicon sequencing other than 16S rRNA, use the Generate FASTQ Workflow (secondary analysis option). For more information, see [MiSeq Reporter Metagenomics Workflow, on page 20](#).



DISCLAIMER

The information in this Illumina Demonstrated Protocol is being provided as a courtesy; in some cases reagents are required to be purchased from non-authorized third-party suppliers. Illumina does not guarantee nor promises technical support for the performance of our products used with reagents purchased from a non-authorized third-party supplier.

Figure 1 16S V3 and V4 Amplicon Workflow

User-defined forward and reverse primers that are complementary upstream and downstream of the region of interest are designed with overhang adapters, and used to amplify templates from genomic DNA. A subsequent limited-cycle amplification step is performed to add multiplexing indices and Illumina sequencing adapters. Libraries are normalized and pooled, and sequenced on the MiSeq system using v3 reagents.

Amplicon Primers

- The gene-specific sequences used in this protocol target the 16S V3 and V4 region. They are selected from the Klindworth et al. publication (Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplles J, Quast C, et al. (2013) Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* 41(1).) as the most promising bacterial primer pair. Illumina adapter overhang nucleotide sequences are added to the gene-specific sequences. The full length primer sequences, using standard IUPAC nucleotide nomenclature, to follow the protocol targeting this region are:

16S Amplicon PCR Forward Primer = 5'

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG

16S Amplicon PCR Reverse Primer = 5'

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC

- This method can also be utilized to target other regions on the genome (either for 16S with other sets of primer pairs, or non-16S regions throughout the genome; ie any amplicon). The overhang adapter sequence must be added to the locus-specific primer for the region to be targeted (Figure 1). The Illumina overhang adapter sequences to be added to locus-specific sequences are:

Forward overhang: 5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-[locus-specific sequence]

Reverse overhang: 5'

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-[locus-specific sequence]

- The following considerations are recommended for designing other locus-specific primers:
 - 5.1 Illumina recommends targeting regions that result in an amplicon that when sequenced with paired-end reads has at least ~50 bp of overlapping sequence in the middle. For example, if running 2x300 bp paired-end reads Illumina recommends having an insert size of 550 bp or smaller so that the bases sequenced at the end of each read overlap.
 - 5.2 The locus-specific portion of primer (not including overhang sequence) must have a melting temperature (T_m) of 60°–65°C. You can use online PCR primer sequence analysis tools (e.g. <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) to check the properties of primer designs. For the T_m calculation only, the gene-specific portion must be used in calculation. For hairpin and dimer calculations, the fully- assembled primer sequence (including the overhang) should be used.
 - 5.3 Illumina recommends using standard desalting purification when ordering oligo primer sets.



NOTE

For more information on reagents used in the protocol, see [Consumables and Equipment, on page 21](#).

16S Library Preparation Workflow

The following diagram illustrates the workflow using the 16S Library Preparation Protocol. Safe stopping points are marked between steps.

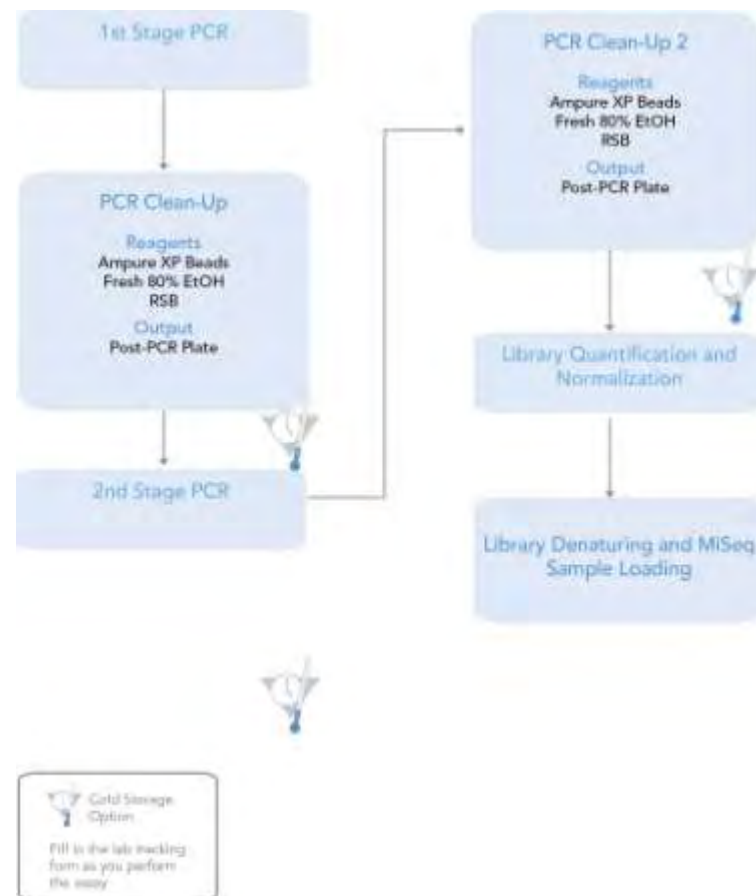


Figure 2 16S Library Preparation Workflow

Amplicon PCR

This step uses PCR to amplify template out of a DNA sample using region of interest-specific primers with overhang adapters attached. For more information on primer sequences, see [Amplicon Primers, on page 3](#).

Consumables



NOTE

For more information on consumables and equipment for this protocol see [Consumables and Equipment, on page 21](#).

Item	Quantity	Storage
Microbial Genomic DNA (5 ng/μl in 10 mM Tris pH 8.5)	2.5 μl per sample	-15° to -25° C
Amplicon PCR Reverse Primer (1 μM)	5 μl per sample	-15° to -25° C
Amplicon PCR Forward Primer (1 μM)	5 μl per sample	-15° to -25° C
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix	12.5 μl per sample	-15° to -25° C
Microseal 'A' film		
96-well 0.2 ml PCR plate	1 plate	
[Optional] Bioanalyzer chip (Agilent DNA 1000 kit catalog # 5067-1504)		

Procedure

- Set up the following reaction of DNA, 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix, and primers:

	Volume
Microbial DNA (5 ng/μl)	2.5 μl
Amplicon PCR Forward Primer 1 μM	5 μl
Amplicon PCR Reverse Primer 1 μM	5 μl
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix	12.5 μl
Total	25 μl

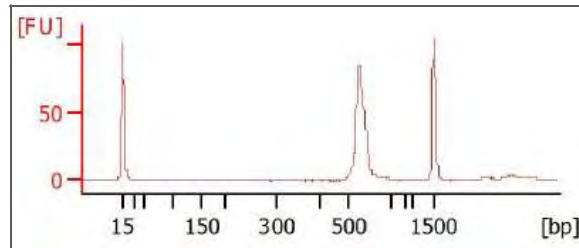
Amplicon PCR

Page 7

- Seal plate and perform PCR in a thermal cycler using the following program:
 - 95°C for 3 minutes
 - 25 cycles of:
 - 95°C for 30 seconds

- 55°C for 30 seconds
 - 72°C for 30 seconds
- 72°C for 5 minutes
- Hold at 4°C
- **[Optional]** Run 1 µl of the PCR product on a Bioanalyzer DNA 1000 chip to verify the size. Using the V3 and V4 primer pairs in the protocol, the expected size on a Bioanalyzer trace after the Amplicon PCR step is ~550 bp.

Figure 3 Example Bioanalyzer Trace after Amplicon PCR Step



PCR Clean- Up

This step uses AMPure XP beads to purify the 16S V3 and V4 amplicon away from free primers and primer dimer species.

Consumables

Item	Quantity	Storage
10 mM Tris pH 8.5	52.5 µl per sample	-15° to -25° C
AMPure XP beads	20 µl per sample	2° to 8° C
Freshly Prepared 80% Ethanol (EtOH)	400 µl per sample	
96-well 0.2 ml PCR plate	1 plate	
[Optional] Microseal 'B' film		
[Optional] 96-well MIDI plate	1 plate	

Preparation

- Bring the AMPure XP beads to room temperature.

Procedure

- Centrifuge the Amplicon PCR plate at 1,000 × g at 20°C for 1 minute to collect condensation, carefully remove seal.
- **[Optional - for use with shaker for mixing]** Using a multichannel pipette set to 25 µl, transfer the entire Amplicon PCR product from the PCR plate to the MIDI plate. Change tips between samples.



NOTE

Transfer the sample to a 96-well MIDI plate if planning to use a shaker for mixing. If mixing by pipette, the sample can remain in the 96-well PCR plate.

- Vortex the AMPure XP beads for 30 seconds to make sure that the beads are evenly dispersed. Add an appropriate volume of beads to a trough depending on the number of samples processing.
- Using a multichannel pipette, add 20 µl of AMPure XP beads to each well of the Amplicon PCR plate. Change tips between columns.
- Gently pipette entire volume up and down 10 times if using a 96-well PCR plate or seal plate and shake at 1800 rpm for 2 minutes if using a MIDI plate.
- Incubate at room temperature without shaking for 5 minutes.
- Place the plate on a magnetic stand for 2 minutes or until the supernatant has cleared.
- With the Amplicon PCR plate on the magnetic stand, use a multichannel pipette to remove and discard the supernatant. Change tips between samples.

- With the Amplicon PCR plate on the magnetic stand, wash the beads with freshly prepared 80% ethanol as follows:
 - o Using a multichannel pipette, add 200 µl of freshly prepared 80% ethanol to each sample well.
 - o Incubate the plate on the magnetic stand for 30 seconds.
 - o Carefully remove and discard the supernatant.
- With the Amplicon PCR plate on the magnetic stand, perform a second ethanol wash as follows:
 - 2 Using a multichannel pipette, add 200 µl of freshly prepared 80% ethanol to each sample well.
 - 3 Incubate the plate on the magnetic stand for 30 seconds.
 - 4 Carefully remove and discard the supernatant.
 - 5 Use a P20 multichannel pipette with fine pipette tips to remove excess ethanol.
- With the Amplicon PCR plate still on the magnetic stand, allow the beads to air-dry for 10 minutes.
- Remove the Amplicon PCR plate from the magnetic stand. Using a multichannel pipette, add 52.5 µl of 10 mM Tris pH 8.5 to each well of the Amplicon PCR plate.
- Gently pipette mix up and down 10 times, changing tips after each column (or seal plate and shake at 1800 rpm for 2 minutes). Make sure that beads are fully resuspended.
- Incubate at room temperature for 2 minutes.
- Place the plate on the magnetic stand for 2 minutes or until the supernatant has cleared.
- Using a multichannel pipette, carefully transfer 50 µl of the supernatant from the Amplicon PCR plate to a new 96-well PCR plate. Change tips between samples to avoid cross-contamination.



SAFE STOPPING POINT

If you do not immediately proceed to *Index PCR*, seal plate with Microseal “B” adhesive seal and store it at -15° to -25°C for up to a week.

Index PCR

This step attaches dual indices and Illumina sequencing adapters using the Nextera XT Index Kit.

Consumables

Item	Quantity	Storage
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix	25 µl per sample	-15° to -25° C
Nextera XT Index 1 Primers (N7XX) from the Nextera XT Index kit (FC-131-1001 or FC-131-1002)	5 µl per sample	-15° to -25° C
Nextera XT Index 2 Primers (S5XX) from the Nextera XT Index kit (FC-131-1001 or FC-131-1002)	5 µl per sample	-15° to -25° C
PCR Grade Water	10 µl per sample	
TruSeq Index Plate Fixture (FC-130-1005)	1	
96-well 0.2 ml PCR plate	1 plate	
Microseal 'A' film	1	

Procedure

- 2 Using a multichannel pipette, transfer 5 µl from each well to a new 96-well plate. The remaining 45 µl is not used in the protocol and can be stored for other uses.
 - 3 Arrange the Index 1 and 2 primers in a rack (i.e. the TruSeq Index Plate Fixture) using the following arrangements as needed:
 - 3.5 Arrange Index 2 primer tubes (white caps, clear solution) vertically, aligned with rows A through H.
 - 3.6 Arrange Index 1 primer tubes (orange caps, yellow solution) horizontally, aligned with columns 1 through 12.
- For more information on index selection, see [Dual Indexing Principle, on page 23](#).

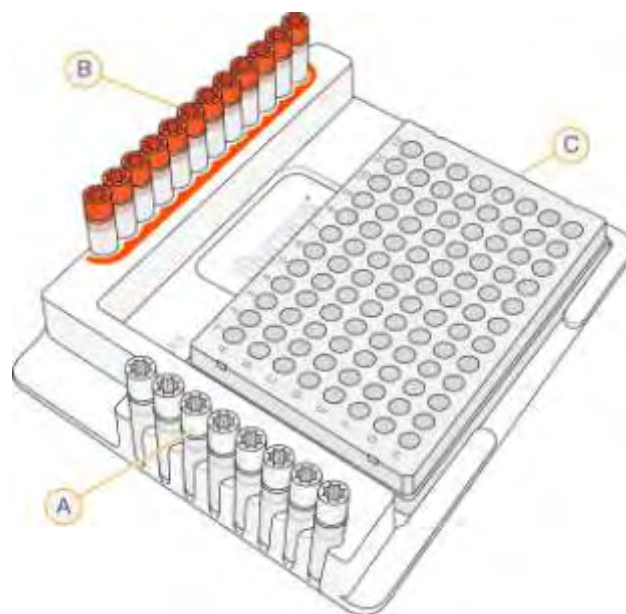


Figure 4 TruSeq Index Plate Fixture

A Index 2 primers (white caps) **B**
Index 1 primers (orange caps) **C**
96-well plate

- 4 Place the 96-well PCR plate with the 5 μ l of resuspended PCR product DNA in the TruSeq Index Plate Fixture.
- 5 Set up the following reaction of DNA, Index 1 and 2 primers, 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix, and PCR Grade water:

	Volume
DNA	5 μ l
Nextera XT Index Primer 1 (N7xx)	5 μ l
Nextera XT Index Primer 2 (S5xx)	5 μ l
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix	25 μ l
PCR Grade water	10 μ l
Total	50 μl

- 6 Gently pipette up and down 10 times to mix.
- 7 Cover the plate with Microseal 'A'.
- 8 Centrifuge the plate at 1,000 \times g at 20°C for 1 minute.

- 9 Perform PCR on a thermal cycler using the following program:
95°C for 3 minutes
8 cycles of:
 95°C for 30 seconds
 55°C for 30 seconds
 72°C for 30 seconds
72°C for 5 minutes
Hold at 4°C

PCR Clean- Up 2

This step uses AMPure XP beads to clean up the final library before quantification.

Consumables

Item	Quantity	Storage
10 mM Tris pH 8.5	27.5 µl per sample	-15° to -25° C
AMPure XP beads	56 µl per sample	2° to 8° C
Freshly Prepared 80% Ethanol (EtOH)	400 µl per sample	
96-well 0.2 ml PCR plate	1 plate	
[Optional] Microseal 'B' film		
[Optional] 96-well MIDI plate	1 plate	

Procedure

- 1 Centrifuge the Index PCR plate at $280 \times g$ at 20°C for 1 minute to collect condensation.
- 2 **[Optional - for use with shaker for mixing]** Using a multichannel pipette set to 50 µl, transfer the entire Index PCR product from the PCR plate to the MIDI plate. Change tips between samples.

NOTE
Transfer the sample to a 96-well MIDI plate if planning to use a shaker for mixing. If mixing by pipette, the sample can remain in the 96-well PCR plate.
- 3 Vortex the AMPure XP beads for 30 seconds to make sure that the beads are evenly dispersed. Add an appropriate volume of beads to a trough.
- 4 Using a multichannel pipette, add 56 µl of AMPure XP beads to each well of the Index PCR plate.
- 5 Gently pipette mix up and down 10 times if using a 96-well PCR plate or seal plate and shake at 1800 rpm for 2 minutes if using a MIDI plate.
- 6 Incubate at room temperature without shaking for 5 minutes.
- 7 Place the plate on a magnetic stand for 2 minutes or until the supernatant has cleared.
- 8 With the Index PCR plate on the magnetic stand, use a multichannel pipette to remove and discard the supernatant. Change tips between samples.
- 9 With the Index PCR plate on the magnetic stand, wash the beads with freshly prepared 80% ethanol as follows:

- a Using a multichannel pipette, add 200 µl of freshly prepared 80% ethanol to each sample well.
 - b Incubate the plate on the magnetic stand for 30 seconds.
 - c Carefully remove and discard the supernatant
- 10 With the Index PCR plate on the magnetic stand, perform a second ethanol wash as follows:
 - a Using a multichannel pipette, add 200 µl of freshly prepared 80% ethanol to each sample well.
 - b Incubate the plate on the magnetic stand for 30 seconds.
 - c Carefully remove and discard the supernatant.
 - d Use a P20 multichannel pipette with fine pipette tips to remove excess ethanol.
 - 11 With the Index PCR plate still on the magnetic stand, allow the beads to air-dry for 10 minutes.
 - 12 Remove the Index PCR plate from the magnetic stand. Using a multichannel pipette, add 27.5 µl of 10 mM Tris pH 8.5 to each well of the Index PCR plate.
 - 13 If using a 96-well PCR plate, gently pipette mix up and down 10 times until beads are fully resuspended, changing tips after each column. If using a MIDI plate, seal plate and shake at 1800 rpm for 2 minutes.
 - 14 Incubate at room temperature for 2 minutes.
 - 15 Place the plate on the magnetic stand for 2 minutes or until the supernatant has cleared.
 - 16 Using a multichannel pipette, carefully transfer 25 µl of the supernatant from the Index PCR plate to a new 96-well PCR plate. Change tips between samples to avoid cross- contamination.



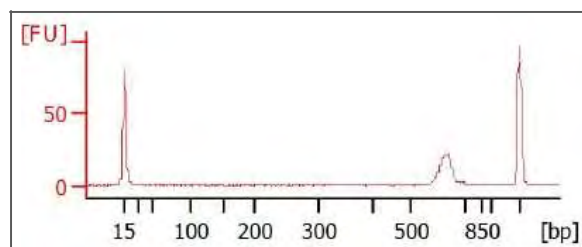
SAFE STOPPING POINT

If you do not plan to proceed to *Library Quantification, Normalization, and Pooling*, on page [16](#), seal the plate with Microseal "B" adhesive seal. Store the plate at -15° to -25°C for up to a week.

[Optional] Validate Library

Run 1 μ l of a 1:50 dilution of the final library on a Bioanalyzer DNA 1000 chip to verify the size. Using the V3 and V4 primer pairs in the protocol, the expected size on a Bioanalyzer trace of the final library is ~630 bp.

Figure 5 Example Bioanalyzer Trace of Final Library



Library Quantification, Normalization, and Pooling

Illumina recommends quantifying your libraries using a fluorometric quantification method that uses dsDNA binding dyes.

Calculate DNA concentration in nM, based on the size of DNA amplicons as determined by an Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer trace:

$$\frac{(\text{concentration in ng/}\mu\text{l})}{(660 \text{ g/mol} \times \text{average library size})} \times 10^6 = \text{concentration in nM}$$

For example:

$$\frac{15 \text{ ng/}\mu\text{l}}{(660 \text{ g/mol} \times 500)} \times 10^6 = 45 \text{ nM}$$

Dilute concentrated final library using Resuspension Buffer (RSB) or 10 mM Tris pH 8.5 to 4 nM. Aliquot 5 μl of diluted DNA from each library and mix aliquots for pooling libraries with unique indices. Depending on coverage needs, up to 96 libraries can be pooled for one MiSeq run.

For metagenomics samples, >100,000 reads per sample is sufficient to fully survey the bacterial composition. This number of reads allows for sample pooling to the maximum level of 96 libraries, given the MiSeq output of > 20 million reads.

Library Denaturing and MiSeq Sample Loading

Page 17

Library Denaturing and MiSeq Sample Loading

In preparation for cluster generation and sequencing, pooled libraries are denatured with NaOH, diluted with hybridization buffer, and then heat denatured before MiSeq sequencing. Each run must include a minimum of 5% PhiX to serve as an internal control for these low- diversity libraries. Illumina recommends using MiSeq v3 reagent kits for improved run metrics.

Consumables

Item	Quantity	Storage
10 mM Tris pH 8.5 or RSB (Resuspension Buffer)	6 µl	-15° to -25°C
HT1 (Hybridization Buffer)	1540 µl	-15° to -25°C
0.2 N NaOH (less than a week old)	10 µl	-15° to -25°C
PhiX Control Kit v3 (FC-110-3001)	4 µl	-15° to -25°C
MiSeq reagent cartridge	1 cartridge	-15° to -25°C
1.7 ml microcentrifuge tubes (screw cap recommended)	3 tubes	
2.5 L ice bucket		

Preparation

- 1 Set a heat block suitable for 1.7 ml microcentrifuge tubes to 96°C
- 2 Remove a MiSeq reagent cartridge from -15°C to -25°C storage and thaw at room temperature.
- 3 In an ice bucket, prepare an ice-water bath by combining 3 parts ice and 1 part water.

Denature DNA

- 1 Combine the following volumes of pooled final DNA library and freshly diluted 0.2 N NaOH in a microcentrifuge tube:
 - 4 nM pooled library (5 µl)
 - 0.2 N NaOH (5 µl)
- 2 Set aside the remaining dilution of 0.2 N NaOH to prepare a PhiX control within the next 12 hours.
- 3 Vortex briefly to mix the sample solution, and then centrifuge the sample solution at 280 × g at 20°C for 1 minute.
- 4 Incubate for 5 minutes at room temperature to denature the DNA into single strands.
- 5 Add the following volume of pre-chilled HT1 to the tube containing denatured DNA:
 - Denatured DNA (10 µl)

- Pre-chilled HT1 (990 µl)

Adding the HT1 results in a 20 pM denatured library in 1 mM NaOH.

- 6 Place the denatured DNA on ice until you are ready to proceed to final dilution.

Dilute Denatured DNA

- 1 Dilute the denatured DNA to the desired concentration using the following example:



NOTE

Illumina recommends targeting 800–1000 K/mm² raw cluster densities using MiSeq v3 reagents. It is suggested to start your first run using a 4 pM loading concentration and adjust subsequent runs appropriately.

Final Concentration	2 pM	4 pM	6 pM	8 pM	10 pM
20 pM denatured library	60 µl	120 µl	180 µl	240 µl	300 µl
Pre-chilled HT1	540 µl	480 µl	420 µl	360 µl	300 µl

- 2 Invert several times to mix and then pulse centrifuge the DNA solution.
- 3 Place the denatured and diluted DNA on ice.

Denature and Dilution of PhiX Control

Use the following instructions to denature and dilute the 10 nM PhiX library to the same loading concentration as the Amplicon library. The final library mixture must contain at least 5% PhiX.

- 1 Combine the following volumes to dilute the PhiX library to 4 nM:
 - 10 nM PhiX library (2 µl)
 - 10 mM Tris pH 8.5 (3 µl)
- 2 Combine the following volumes of 4 nM PhiX and 0.2 N NaOH in a microcentrifuge tube:
 - 4 nM PhiX library (5 µl)
 - 0.2 N NaOH (5 µl)
- 3 Vortex briefly to mix the 2 nM PhiX library solution.
- 4 Incubate for 5 minutes at room temperature to denature the PhiX library into single strands.
- 5 Add the following volumes of pre-chilled HT1 to the tube containing denatured PhiX library to result in a 20 pM PhiX library:
 - Denatured PhiX library (10 µl)
 - Pre-chilled HT1 (990 µl)
- 6 Dilute the denatured 20 pM PhiX library to the same loading concentration as the Amplicon library as follows:

Final Concentration	2 pM	4 pM	6 pM	8 pM	10 pM
20 pM denatured library	60 µl	120 µl	180 µl	240 µl	300 µl
Pre-chilled HT1	540 µl	480 µl	420 µl	360 µl	300 µl

- 7 Invert several times to mix and then pulse centrifuge the DNA solution.
- 8 Place the denatured and diluted PhiX on ice.

Combine Amplicon Library and PhiX Control



NOTE

The recommended PhiX control spike-in of $\geq 5\%$ for low diversity libraries is possible with RTA v1.17.28 or later, which is bundled with MCS v2.2. For optimal performance, update to v3 software (MCS 2.3). If you are using an older version of the MiSeq software or sequencing these libraries on the GA or HiSeq, Illumina recommends using $\geq 25\%$ PhiX control spike-in.

- 1 Combine the following volumes of denatured PhiX control library and your denatured amplicon library in a microcentrifuge tube:
 - Denatured and diluted PhiX control (30 µl)
 - Denatured and diluted amplicon library (570 µl)
- 2 Set the combined sample library and PhiX control aside on ice until you are ready to heat denature the mixture immediately before loading it onto the MiSeq v3 reagent cartridge.
- 3 Using a heat block, incubate the combined library and PhiX control tube at 96°C for 2 minutes.
- 4 After the incubation, invert the tube 1–2 times to mix and immediately place in the ice- water bath.
- 5 Keep the tube in the ice-water bath for 5 minutes.



NOTE

Perform the heat denaturation step immediately before loading the library into the MiSeq reagent cartridge to ensure efficient template loading on the MiSeq flow cell.

MiSeq Reporter Metagenomics Workflow

After samples are loaded, the MiSeq system provides on-instrument secondary analysis using the MiSeq Reporter software (MSR). MSR provides several options for analyzing MiSeq sequencing data. For this demonstrated 16S protocol, select the Metagenomics workflow.

By following this 16S Metagenomics protocol, the Metagenomics workflow classifies organisms from your V3 and V4 amplicon using a database of 16S rRNA data. The classification is based on the Greengenes database (<http://greengenes.lbl.gov/>). The output of this workflow is a classification of reads at several taxonomic levels: kingdom, phylum, class, order, family, genus, and species. The analysis output includes:

- Clusters Graph – shows numbers of raw cluster, clusters passing filter, clusters that did not align, clusters not associated with an index, and duplicates.
- Sample Table – summarizes the sequencing results for each sample.
- Cluster Pie Chart – a graphical representation of the classification breakdown for each sample.

See the *MiSeq Reporter Metagenomics Workflow – Reference Guide* (Part # 15042317) for detailed instructions and guidance.

The method described in this 16S Metagenomics protocol can be used for any targeted amplicon sequencing, relevant to virus research, mutation detection, or other microbiology- related studies. If you use the protocol for other targeted amplicon sequencing studies, select the MiSeq Reporter Generate FASTQ Workflow for on-instrument generation of FASTQ files for downstream analysis. For specific guidance on the Generate FASTQ Workflow, see the *MiSeq Reporter Generate FASTQ Workflow – Reference Guide* (Part # 15042322).

Supporting Information

The protocols described in this guide assume that you are familiar with the contents of this section and have obtained all of the requisite equipment and consumables.

Acronyms

Table 1 Acronyms

Acronym	Definition
HT1	Hybridization Buffer
IEM	Illumina Experiment Manager
MSR	MiSeq Reporter
PCR	Polymerase Chain Reaction
rRNA	Ribosomal RNA
RSB	Resuspension Buffer

Consumables and Equipment

Check to make sure that you have all of the necessary user-supplied consumables and equipment before proceeding to sample preparation.

Table 2 User-Supplied Consumables

Consumable	Supplier
1.7 ml microcentrifuge tubes	General lab supplier
10 µl barrier pipette tips	General lab supplier
10 µl multichannel pipettes	General lab supplier
10 µl single channel pipettes	General lab supplier
20 µl barrier pipette tips	General lab supplier
20 µl multichannel pipettes	General lab supplier
20 µl single channel pipettes	General lab supplier
200 µl barrier pipette tips	General lab supplier

200 µl multichannel pipettes	General lab supplier
200 µl single channel pipettes	General lab supplier
1000 µl barrier pipette tips	General lab supplier

Supporting Information

Page 22

Consumable	Supplier
1000 µl multichannel pipettes	General lab supplier
1000 µl single channel pipettes	General lab supplier
96-well 0.2 ml skirtless PCR plates or Twin.Tec 96-well PCR plates	Bio-Rad, part # MSP-9601
Agencourt AMPure XP 60 ml kit	Beckman Coulter Genomics, part # A63881
Ethanol 200 proof (absolute) for molecular biology (500 ml)	Sigma-Aldrich, part # E7023
Amplicon PCR Forward Primer (Standard desalting)	
Amplicon PCR Reverse Primer (Standard desalting)	
KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X)	KAPA Biosystems, part # KK2601
Microseal 'A' adhesive seals	Bio-Rad, part # MSA-5001
Microseal 'B' adhesive seals	Bio-Rad, part # MSB-1001
MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycle)	Illumina, catalog # MS-102-3003
Nextera XT Index Kit	Illumina, catalog # FC-131-1001 or Illumina, catalog # FC-131-1002
PhiX Control Kit v3	Illumina, catalog # FC-110-3001
PCR grade water	General lab supplier
Fluorometric quantitation with dsDNA binding dye reagents	General lab supplier
RNase/DNase-free 8-well PCR strip tubes and caps	General lab supplier
RNase/DNase-free multichannel reagent reservoirs, disposable	VWR, part # 89094-658
Tris-HCl 10 mM, pH 8.5	General lab supplier
[Optional] 96-well storage plates, round well, 0.8 ml ("MIDI" plate)	Fisher Scientific, part # AB-0859

Table 3 User-Supplied Equipment

Equipment	Supplier
2.5 L ice bucket	General lab supplier
96-well thermal cycler (with heated lid)	General lab supplier

Equipment	Supplier
Fluorometer for quantitation with dsDNA binding dyes	General lab supplier
Magnetic stand-96	Life Technologies, catalog # AM10027
Microplate centrifuge	General lab supplier
TruSeq Index Plate Fixture Kit (reusable)	Illumina, catalog # FC-130-1005
[Optional] 2100 Bioanalyzer Desktop System	Agilent, part # G2940CA
[Optional] Agilent DNA 1000 Kit	Agilent, part # 5067-1504
[Optional] High Speed Micro Plate Shaker	VWR, catalog # 13500-890 (110V/120V) or VWR, catalog # 14216-214 (230V)

Dual Indexing Principle

The dual indexing strategy uses two 8 base indices, Index 1 (i7) adjacent to the P7 sequence, and Index 2 (i5) adjacent to the P5 sequence. Dual indexing is enabled by adding a unique Index 1 (i7) and Index 2 (i5) to each sample. The 96 sample Nextera XT Index Kit (FC-131–1002) use 12 different Index 1 (i7) adapters (N701–N712) and 8 different Index 2 (i5) adapters (S501–S508). The 24 sample Nextera XT Index Kit (FC-131–1001) uses 6 different Index 1 (i7) adapters (N701–N706) and 4 different Index 2 (i5) adapters (S501–S504). In the Index adapter name, the N or S refers to Nextera XT sample preparation, 7 or 5 refers to Index 1 (i7) or Index 2 (i5), respectively. The 01–12 refers to the Index number. A list of index sequences is provided for generating sample sheets to demultiplex the samples:

Index 1 (i7)	Sequence	Index 2 (i5)	Sequence
N701	TAAGGCGA	S501	TAGATCGC
N702	CGTACTAG	S502	CTCTCTAT
N703	AGGCAGAA	S503	TATCCTCT
N704	TCCTGAGC	S504	AGAGTAGA
N705	GGACTCCT	S505	GTAAGGAG
N706	TAGGCATG	S506	ACTGCATA
N707	CTCTCTAC	S507	AAGGAGTA
N708	CAGAGAGG	S508	CTAAGCCT
N709	GCTACGCT		
N710	CGAGGCTG		
N711	AAGAGGCA		
N712	GTAGAGGA		

Low Plexity Pooling Guidelines

Illumina uses a green laser or LED to sequence G/T and a red laser or LED to sequence A/C. At each cycle, at least one of two nucleotides for each color channel are read to ensure proper registration. It is important to maintain color balance for each base of the index read

being sequenced, otherwise index read sequencing could fail due to registration failure. If you choose the dual-indexed sequencing workflow, always use at least two unique and

compatible barcodes for each index (index 1 and index 2). The following tables illustrate possible pooling strategies:

Table 4 Libraries Pooled: 6 or fewer; Sequencing Workflow: Single Index

Plex	Index 1 (i7) Selection	Index 2 (i5) Selection
1-plex (no pooling)	Any Index 1 adapter	Any Index 2 adapter
2-plex	<ul style="list-style-type: none"> • [option 1] N702 and N701 • [option 2] N702 and N704 	
3-plex	<ul style="list-style-type: none"> • [option 1] N701, N702, and N704 • [option 2] N703, N705, and N706 	
4- or 5-plex	<ul style="list-style-type: none"> • [option 1] N701, N702, N704, and any other Index 1 adapter • [option 2] N703, N705, N706, and any other Index 1 adapter 	
6-plex	N701, N702, N703, N704, N705, and N706	

Table 5 Sequencing Workflow: Single or Dual Index

Plex	Index 1 (i7) Selection	Index 2 (i5) Selection
7-12 plex, Dual Index	<ul style="list-style-type: none"> • [option 1] N701, N702, N704, and any other Index 1 adapter (as needed) • [option 2] N703, N705, N706, and any other Index 1 adapter (as needed) 	<ul style="list-style-type: none"> • [option 1] S501 and S502 • [option 2] S503 and S504 • [option 3] S505 and S506
7-12 plex, Single Index (96 sample Nextera Index adapter kit)	• N701-N706 and any other Index 1 adapter (as needed)	• Any Index 2 (i5) adapter
Greater than 12-plex	N701, N702, N703, N704, N705, N706, and any other Index 1 adapter	<ul style="list-style-type: none"> • [option 1] S501, S502, and any other Index 2 adapter (as needed) • [option 2] S503, S504, and any other Index 2 adapter (as needed) • [option 3] S505, S506, and any other Index 2 adapter (as needed)

Supporting Information

Page 25

These strategies represent only some of the acceptable combinations. Alternatively, check the real sequences of each index in the tables to make sure that each base position has a signal in both color channels for the index read:

Good	Bad
------	-----

Index 1		Index 2		Index 1		Index 2	
705	GGACTCCT	503	TATCCTCT	705	GGACTCCT	502	CTCTCTAT
706	TAGGCATG	503	TATCCTCT	706	TAGGCATG	502	CTCTCTAT
701	TAAGGCGA	504	AGAGTAGA	701	TAAGGCGA	503	TATCCTCT
702	CGTACTAG	504	AGAGTAGA	702	CGTACTAG	503	TATCCTCT
	////////		////////		////////		//// xxxx

v=signal in both color

x=signal missing in one color channel

Prevent PCR Product Contamination

The PCR process is commonly used in the laboratory to amplify specific DNA sequences. Unless proper laboratory hygiene is used, PCR products can contaminate reagents, instrumentation, and genomic DNA samples, causing inaccurate and unreliable results. PCR product contamination can shut down lab processes and significantly delay normal operations.

Make sure that the lab is set up appropriately to reduce the risk of PCR product contamination:

- **Physically Separate Pre-PCR and Post-PCR Areas**
 - Physically separate laboratory space where pre-PCR processes are performed (DNA extraction, quantification, and normalization) from the laboratory space where PCR products are made and processed (post-PCR processes).
 - Never use the same sink to wash pre-PCR and post-PCR troughs.
 - Never share water purification systems for pre-PCR and post-PCR processes.
 - Store all supplies used in the protocols in the pre-PCR area, and transfer to the post-PCR area as needed.
- **Use Dedicated Equipment and Supplies**
 - Dedicate separate full sets of equipment and supplies (pipettes, centrifuges, oven, heat block, etc.) to pre-PCR and post-PCR lab processes, and never share between processes.
 - Dedicate separate storage areas (freezers and refrigerators) to pre-PCR and post-PCR consumables.

Because the pre- and post-amplification reagents are shipped together, it is important to unpack the reagents in the pre-PCR lab area. After unpacking the reagents, move the post-amplification reagents to the proper post-PCR storage area.

Pre- PCR and Post- PCR Lab Procedures

To prevent PCR product contamination, it is important to establish lab procedures and follow best practices. Illumina recommends daily and weekly cleaning of lab areas using

0.5% Sodium Hypochlorite (10% Bleach).

**CAUTION**

To prevent sample or reagent degradation, make sure that all vapors from the cleaning solution have fully dissipated before beginning any processes.

Daily Cleaning of Pre- PCR Area

A daily cleaning of the pre-PCR area using a 0.5% Sodium Hypochlorite (10% Bleach) solution helps to eliminate PCR product that has entered the pre-PCR area.

Identify pre-PCR areas that pose the highest risk of contamination, and clean these areas with a 0.5% Sodium Hypochlorite (10% Bleach) solution before beginning any pre-PCR processes. High-risk areas might include, but are not limited to, the following items:

- Benchtops
- Door handles
- Refrigerator/freezer door handles
- Computer mouse
- Keyboards

Daily Cleaning of Post- PCR Area

Reducing the amount of PCR product in the post-PCR area helps reduce the risk of contamination in the pre-PCR area. Daily cleaning of the post-PCR area using a 0.5% Sodium Hypochlorite (10% Bleach) solution helps reduce the risk of contamination.

Identify post-PCR areas that pose the highest risk of contamination, and clean these areas with a 0.5% Sodium Hypochlorite (10% Bleach) solution daily. High-risk areas might include, but are not limited to, the following items:

- Thermal cyclers
- Bench space used to process amplified DNA
- Door handles
- Refrigerator/freezer door handles
- Computer mouse
- Keyboards

Weekly Cleaning of All Lab Areas

One time a week, perform a thorough cleaning of the pre-PCR and post-PCR areas using 0.5% Sodium Hypochlorite (10% Bleach).

- Clean all benchtops and laboratory surfaces.
- Clean all instruments that are not cleaned daily.
- Thoroughly mop lab floors.
- Make sure that personnel responsible for weekly cleaning are properly trained on prevention of PCR product contamination.

Items Fallen to the Floor

The floor is contaminated with PCR product transferred on the shoes of individuals coming from the post-PCR area; therefore, anything falling to the floor must be treated as contaminated.

- Disposable items that have fallen to the floor, such as empty tubes, pipette tips, gloves, lab coat hangers, must be discarded.

- Non-disposable items that have fallen to the floor, such as a pipette or an important sample container, must be immediately and thoroughly cleaned. Use a 0.5% Sodium Hypochlorite (10% Bleach) solution to remove PCR product contamination.
- Clean any lab surface that has come in contact with the contaminated item. Individuals handling anything that has fallen to the floor, disposable or non-disposable, must discard their lab gloves and put on a new pair.

Best Practices

When preparing libraries for sequencing, always adhere to good molecular biology practices. Read through the entire protocol before starting to make sure that all of the required materials are available and your equipment is programmed and ready to use.

Handling Liquids

Good liquid handling measures are essential, particularly when quantifying libraries or diluting concentrated libraries for making clusters.

- Small differences in volumes ($\pm 0.5 \mu\text{l}$) can sometimes cause large differences in cluster numbers ($\sim 100,000$).
- Small volume pipetting can be a source of potential error in protocols requiring the generation of standard curves, such as qPCR, or small but precise volumes, such as the Agilent Bioanalyzer.
- If small volumes are unavoidable, use due diligence to make sure that pipettes are correctly calibrated.
- Make sure that pipettes are not used at the volume extremes of their performance specifications.
- Prepare the reagents for multiple samples simultaneously, to minimize pipetting errors, especially with small volume enzyme additions. As a result, pipette one time from the reagent tubes with a larger volume, rather than many times with small volumes. Aliquot to individual samples in a single pipetting movement to allow for standardization across multiple samples.

Handling Magnetic Beads



NOTE

Cleanup procedures have only been validated using the 96-well plates and the magnetic stand specified in the *Consumables and Equipment* list. Comparable performance is not guaranteed when using a microcentrifuge tube or other formats, or other magnets.

- Before use, allow the beads to come to room temperature.
- Do not reuse beads. Always add fresh beads when performing these procedures.
- Immediately before use, vortex the beads until they are well dispersed and the color of the liquid is homogeneous.
- When pipetting the beads, pipette slowly and dispense slowly due to the viscosity of the solution.
- Take care to minimize bead loss, which can affect final yields.

- Change the tips for each sample, unless specified otherwise.
- Let the mixed samples incubate at room temperature for the time indicated in the protocol for maximum recovery.

- When removing and discarding supernatant from the wells, use a single channel or multichannel pipette and take care not to disturb the beads.
- When aspirating the cleared solution from the reaction plate and wash step, it is important to keep the plate on the magnetic stand and not disturb the separated magnetic beads. Aspirate slowly to prevent the beads from sliding down the sides of the wells and into the pipette tips.
- To prevent the carryover of beads after elution, approximately 2.5 µl of supernatant is left when the eluates are removed from the bead pellet.
- Be sure to remove all of the ethanol from the bottom of the wells, as it can contain residual contaminants.
- Keep the reaction plate on the magnetic stand and let it air-dry at room temperature to prevent potential bead loss due to electrostatic forces. Allow for the complete evaporation of residual ethanol, because the presence of ethanol affects the performance of the subsequent reactions. Illumina recommends at least minutes drying time, but a longer drying time can be required. Remaining ethanol can be removed with a 10 µl pipette.
- Avoid over drying the beads, which can impact final yields.
- Do not scrape the beads from the edge of the well using the pipette tip.
- To maximize sample recovery during elution, incubate the sample/bead mix for 2 minutes at room temperature before placing the samples onto the magnet.

Avoiding Cross- Contamination

Practice the following to avoid cross-contamination:

- Open only one adapter tube at a time.
- Change the tips for each sample, unless specified otherwise.
- Pipette carefully to avoid spillage.
- Clean pipettes and change gloves between handling different adapter stocks.
- Clean work surfaces thoroughly before and after the procedure.

Potential DNA Contaminants

When handling and processing samples using this protocol, use best practices to avoid PCR contamination, as you would when preparing PCR amplicons.

Temperature Considerations

Temperature is an important consideration for making libraries:

- Keep libraries at temperatures $\leq 37^{\circ}\text{C}$, except where specifically noted.
- Place reagents on ice after thawing at room temperature.

Equipment

- Review the programming instructions for your thermal cycler user guide to make sure that it is programmed appropriately using the heated lid function.
- It is acceptable to use the thermal cycler tracked heating lid function.